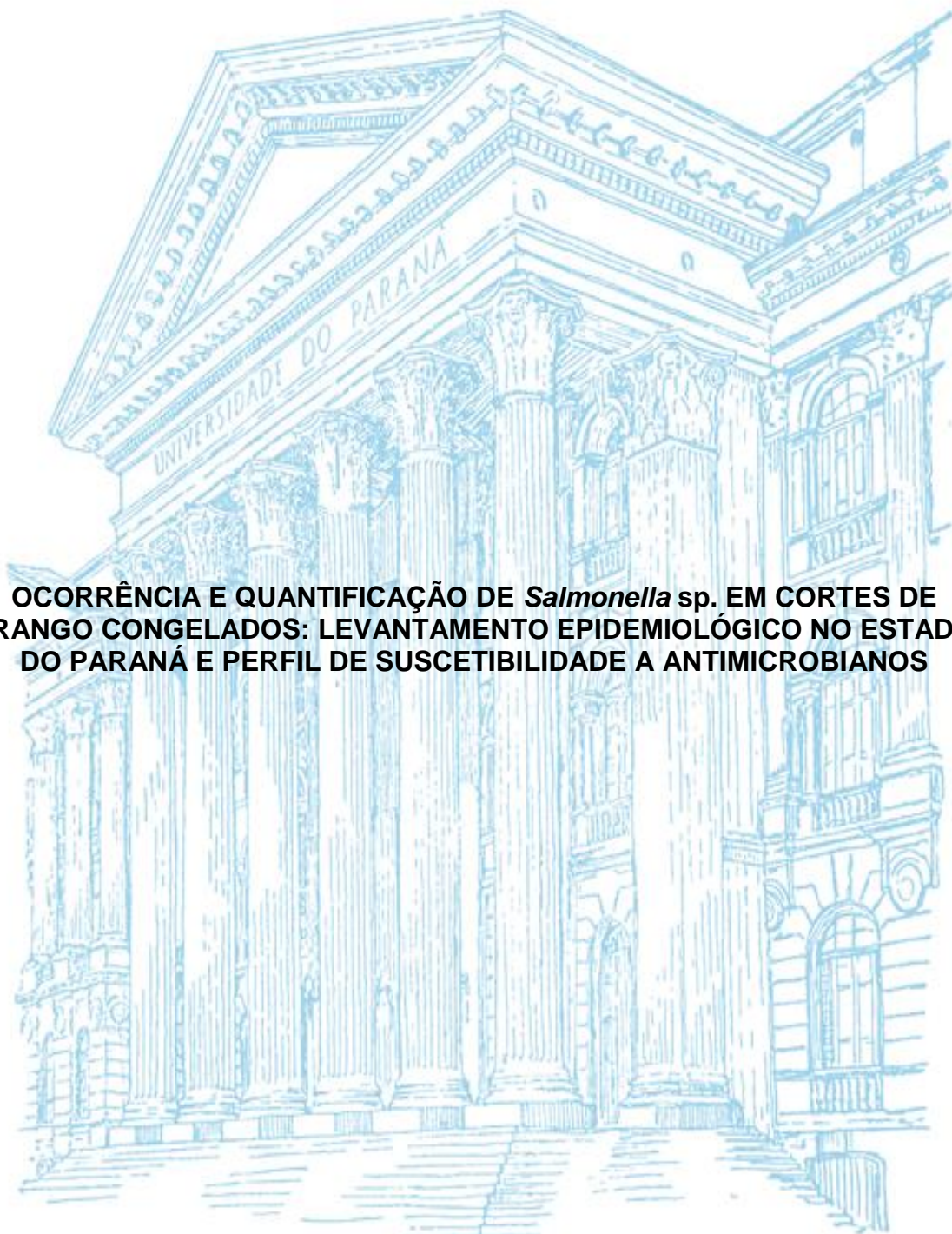


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA PERIN

OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp. EM CORTES DE FRANGO CONGELADOS: LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO NO ESTADO DO PARANÁ E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS



PALOTINA

2017

ANA PAULA PERIN

OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp. EM CORTES DE FRANGO CONGELADOS: LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO NO ESTADO DO PARANÁ E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P445 Perin, Ana Paula
Ocorrência e quantificação de *Salmonella* sp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no estado do Paraná e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos / Ana Paula Perin. – Palotina, 2017.
103f.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1. *bla*CTX-M-2 . 2. Dose Infectante 3. Multirresistência.
I. Bersot, Luciano dos Santos .II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.9

Ficha catalográfica elaborada por Aparecida Pereira dos Santos– CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL


TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA PAULA PERIN** intitulada: **OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella sp.* EM CORTES DE FRANGO CONGELADOS: LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO NO ESTADO DO PARANÁ E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Palotina, 23 de Fevereiro de 2017.


LUCIANO DOS SANTOS BERSOT

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LUIS AUGUSTO NERO
Avaliador Externo (UFV)


RICARDO SEITI YAMATO GI
Avaliador Externo (UFV)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Ana Paula Perin, filha de Clarice Cima Perin e Wanderlei Perin, nascida em 28 de julho de 1989 no município de Iraí, estado do Rio Grande do Sul. Médica Veterinária formada no ano de 2012 pela Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Analista do Controle de Qualidade na empresa Aurora Alimentos entre os anos 2012 e 2013. Residente em Inspeção de Produtos de Origem Animal no Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (2013-2015). Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na linha de pesquisa Microbiologia aplicada à Produção Animal.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por ter me possibilitado tantas escolhas corretas ao longo de minha vida. Agradeço também toda capacidade, vontade e paciência que a mim delegou.

Aos meus pais, os quais, apesar de toda dificuldade, sempre priorizaram a educação das filhas, colocando minha formação pessoal e profissional em primeiro plano. Apesar das poucas visitas nesses últimos 9 anos (faculdade, residência e mestrado), devido aos quilômetros de distância, nossas conversas por telefone me ajudaram a superar toda saudade e chegar até aqui.

Ao meu namorado, Rafael Schueroff de Meira, pelo apoio incondicional durante todo período do mestrado, me auxiliando em todos os momentos de estresse, cansaço e esgotamento. Agradeço também pelo seu companheirismo diário e por seu amor sem medida para comigo e nossas “filhas” de quatro patas, Luna e Nina. Sem você tudo teria sido muito mais difícil.

À UFPR e a todos os antigos e atuais colegas de trabalho do LACOMA, em especial a Camila, Rosangela, Nelson, Ana, Ananiza e Maira. Com certeza meus dias foram muito mais alegres e produtivos ao lado de vocês.

Ao Professor Marco Antonio Barreiros, por todo auxílio durante a análise dos dados moleculares deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Luciano dos Santos Bersot, obrigada por toda paciência desde a residência até o término do mestrado. Agradeço muito por todo aprendizado, formação técnica e construção pessoal.

A todos os amigos que Palotina me proporcionou, desde 2012 até hoje, muito obrigada pelo acolhimento.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Professor Luís Augusto Nero, por disponibilizar todos os equipamentos e estrutura necessária para realização de etapas do presente trabalho.

A todo pessoal do laboratório de inspeção da UFV, em especial à Bruna, Emilene e ao Professor Ricardo. Obrigada por me apresentarem às técnicas moleculares. Bruna, obrigada por sua paciência infinita e disposição em ajudar, serei eternamente grata.

Por fim, agradeço à Fundação Araucária, agência financiadora do projeto, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos. Muito obrigada!

“Trabalhe duro e em silêncio. Deixe que o seu sucesso faça barulho.”

Dale Carnegie

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência, quantificar e identificar os sorotipos de *Salmonella* sp. presentes em cortes de frango congelados produzidos e comercializados em todo o Estado do Paraná. Foram avaliados 300 cortes de frango variados, coletados no varejo, em todas as regiões produtoras do estado do Paraná. Todas as amostras passaram por uma avaliação inicial de sua embalagem, onde foi verificada a integridade e o atendimento às normas legais. A quantificação de *Salmonella* sp. foi obtida por meio da metodologia de mNMP, determinada pela ISO/TS 6579-2:2012. Para verificação da presença/ausência utilizou-se a metodologia ISO/TS 6579:2002. Também foi realizada a quantificação de coliformes termotolerantes em 154 dessas amostras, avaliando sua conformidade em relação à RDC nº 12 de 2001. Além disso, foram realizados testes fenotípicos e genotípicos de suscetibilidade antimicrobiana e produção de enzimas ESBL. Das 300 amostras analisadas, 95 (31,5%) apresentaram *Salmonella* sp., sendo os sorotipos identificados como Typhimurium (43%), Heidelberg (39%), Ndolo (6%), Minnesota (4%), O:4,5 (2%), Thompson (2%), Schwarzengrund (2%), O:3, 10:e, h:- (1%) e Abony (1%). A quantificação demonstrou baixa carga de *Salmonella* sp., variando de 0,12 a 6,4 NMP/g. Todas as 154 amostras apresentam contagem de coliformes termotolerantes de acordo com os padrões legais. Foi constatada a presença de perfil multirresistente em 85 (86,7%) isolados de *Salmonella* sp., sendo que 13 desses demonstraram possuir genes que codificam enzimas ESBL, especialmente *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{TEM-1}.

Palavras-chave: *bla*_{CTX-M-2}. Dose Infectante. Multirresistência. S. Heidelberg. S. Ndolo. S. Typhimurium.

ABSTRACT

The objective of this work was to verify the occurrence, quantify and identify the serotypes of *Salmonella* sp. present in frozen chicken parts produced and marketed throughout the State of Paraná. A total of 300 varied chicken parts were collected in the retail market in all producing regions of the state of Paraná. All the samples underwent an initial assessment of their packaging, where the integrity and compliance with legal regulations were verified. The quantification of *Salmonella* sp. was obtained using the methodology of mNMP, determined by ISO/ST 6579-2:2012. ISO/ST 6579:2002 methodology was used to verify presence/absence. Quantification of thermotolerant coliforms was also carried out in 154 of these samples, evaluating their compliance with RDC nº 12 of 2001. In addition, phenotypic and genotypic tests of antimicrobial susceptibility and ESBL production were performed. Of the 300 samples analyzed, 95 (31.5%) presented *Salmonella* sp., with serotypes identified as Typhimurium (43%), Heidelberg (39%), Ndolo (6%), Minnesota (4%), O: 4,5 (2%), Thompson (2%), Schwarzengrund (2%), O: 3, 10: e, h :- (1%) and Abony (1%). Quantification showed low *Salmonella* sp. loading, ranging from 0.12 to 6.4 MPN/g. All the 154 samples present count of thermotolerant coliforms according to the legal standards. The presence of a multidrug-resistant profile in 85 (86.7%) of *Salmonella* sp. strains was reported, 13 of which were found to have ESBL-encoding genes, especially *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{TEM-1}.

Key-words: *bla*_{CTX-M-2}. Infectant dose. Multiresistance. S. Heidelberg. S. Ndolo. S. Typhimurium.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - QUANTIDADE DE MATADOUROS DE AVES E AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO ANALISADAS POR REGIÃO DO ESTADO DO PARANÁ.....	42
FIGURA 2 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCEDIMENTO AO QUAL AS AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO FORAM SUBMETIDAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SP.....	45
FIGURA 3 - QUANTIDADE DE NÃO CONFORMIDADES ENCONTRADAS EM RÓTULOS E EMBALAGENS DE CORTES DE FRANGO CONGELADOS PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ.....	56
FIGURA 4 - EMBALAGEM DE CORTES DE FRANGO (SOBRECOXA) COM A DATA DE FABRICAÇÃO POSTERIOR À DATA DE VALIDADE.....	56
FIGURA 5 - AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO CONTENDO CORPOS ESTRANHOS.....	58
FIGURA 6 - QUANTIDADE DE ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP. SENSÍVEIS E RESISTENTES A CADA AGENTE ANTIMICROBIANO TESTADO.....	69
FIGURA 7 - TESTE DE TRIAGEM FENOTÍPICA PARA PRESENÇA DE ENZIMAS ESBL EM ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP.....	72
FIGURA 8 - GEL DE PCR CONFIRMANDO A PRESENÇA DOS GENES <i>BLA_{CTX-M}</i> E <i>BLA_{TEM}</i> EM ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP. POSITIVOS NA TRIAGEM FENOTÍPICA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS ESBL.....	72
FIGURA 9 - DENDOGRAMA, OBTIDO POR MEIO DE PFGE (<i>XBA</i> I), INDICANDO A RELAÇÃO GENÉTICA E O PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DOS 98 ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP. OBTIDOS DE CORTES DE FRANGO PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ.....	75

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PARÂMETROS AVALIADOS NOS RÓTULOS E EMBALAGENS DE CORTES DE FRANGO CONGELADOS E SUAS RESPECTIVAS BASES LEGAIS.....	43
QUADRO 2 - SEQUÊNCIA DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>SALMONELLA</i> SP.....	50
QUADRO 3 - SEQUÊNCIAS DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA AVALIAR A PRESENÇA DOS GENES <i>CATAI</i> , <i>TETA</i> , <i>TETB1</i> , <i>Z0055</i> , <i>SUL1</i> E <i>SUL2</i> NOS ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP.....	51
QUADRO 4 - SEQUÊNCIAS DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA AVALIAR A PRESENÇA DE GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS ESBL EM ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP.....	52
QUADRO 5 - FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DOS 98 ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP. OBTIDOS DE CORTES DE FRANGO FRENTE AOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NÚMERO DE SOROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> EM CADA ESPÉCIE E SUBESPÉCIE.	26
TABELA 2 - FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> SP. EM CARCAÇAS E CORTES DE FRANGO EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.....	39
TABELA 3 - NÚMERO DE AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO ONDE FOI ENCONTRADO <i>SALMONELLA</i> SP. DE ACORDO COM A METODOLOGIA UTILIZADA.	60
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO QUE APRESENTARAM VALORES DE <i>SALMONELLA</i> SP. QUANTIFICÁVEIS PELA TÉCNICA DE MNMP.....	61
TABELA 5 - AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO CONGELADO POSITIVAS PARA <i>SALMONELLA</i> SP. CONSIDERANDO O PERCENTUAL POR TIPO DE CORTE E O PERCENTUAL POR TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS.....	63
TABELA 6 - OCORRÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> SP. POR REGIÃO PRODUTORA DE CORTES DE FRANGO NO ESTADO DO PARANÁ.....	65
TABELA 7- FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP. FRENTE ÀS CLASSES DE ANTIMICROBIANOS TESTADOS.....	67
TABELA 8 - RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS SOROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> SP. ISOLADOS DE CORTES DE FRANGO PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 2015 E 2016.....	71
TABELA 9 - SOROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> SP. ENCONTRADOS EM CORTES DE FRANGO PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 2015 E 2016.....	76
TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP. PRODUTORAS DE ENZIMAS ESBL OBTIDAS DE CORTES DE FRANGO PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMC	Amoxicilina com Ácido Clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT	Água Peptonada Tamponada
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztreonam
BG	Brilliant Green (Verde Brilhante)
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BS	Bismuto Sulfito
C	Conforme
CAZ	Ceftazidime
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CNPJ	Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxone
CT	Coliformes Termotolerantes
CTX	Cefotaxime
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxiciclina
DVA	Doença Veiculada por Alimentos
ESBL	Beta-lactamases de Espectro Estendido
EC	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
GEN	Gentamicina
IN	Instrução Normativa
InsPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
IPM	Imipenem
IQF	Individually Quick Frozen
ISO	International Organization for Standardization
LACEN	Laboratório Central do Estado do Paraná
LACOMA	Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água
LIA	Lisina Ferro
LST	Lauril Sulfato de Sódio
mA	Miliampere
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MER	Meropenem
MKTT	Tetrationato Muller-Kauffmann
mNMP	Número Mais Provável Miniaturizado
MR	Multirresistente
MSRV	Rappaport-Vassiliadis Semissólido
NAL	Ácido Nalidíxico
NC	Não Conforme
NMP	Número Mais Provável
NMP/g	Número Mais Provável por Grama
pb	Par de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
PREBAF	Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango
PR/HACCP	Pathogen Reduction and Hazard Analysis and Critical Control Point
PRP	Programa de Redução de Patógenos

RCPBS	Raw Chicken Parts Baseline Survey
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RPM	Rotação Por Minuto
RT-PCR	PCR <i>Real-Time</i>
RVS	Rappaport-Vassiliadis Soya
SAC	Serviço de Atendimento ao Consumidor
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Sulfeto-Indol-Motilidade
SUT	Sulfametoxazol com Trimetoprim
TET	Tetraciclina
TOB	Tobramicina
TSB	Caldo Triptona de Soja
TSI	Tríplice Açúcar Ferro
U	Unidade
UE	União Europeia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por Grama
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UPGMA	Unweighed Pair Group Method Using Arithmetic Average
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 PRODUÇÃO PARANAENSE DE CARNE DE FRANGO	21
3.2 EMBALAGEM E ROTULAGEM DE CARNE DE AVES	22
3.3 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL	23
3.4 <i>SALMONELLA</i> SP	24
3.4.1 Aspectos gerais	24
3.4.2 Relevância para saúde pública	27
3.4.3 Dose infectante e quantificação de <i>Salmonella</i> sp. pela metodologia de Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP)	30
3.4.4 Mecanismos de resistência a antimicrobianos	32
3.4.4.1 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)	34
3.4.5 Medidas de controle	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 AMOSTRAGEM	41
4.2 AVALIAÇÃO DE ROTULAGEM E EMBALAGEM	42
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	43
4.3.1 Coliformes termotolerantes	43
4.3.2 <i>Salmonella</i> spp	44
4.3.2.1 Quantificação por mNMP	44
4.3.2.2 Verificação da Presença/Ausência	47
4.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	48
4.4.1 Triagem para produção de enzimas ESBL	49
4.5 ANÁLISES MOLECULARES	49
4.5.1 Extração de DNA	49
4.5.2 Confirmação de gênero	50
4.5.3 Pesquisa de genes que conferem resistência aos antimicrobianos Cloranfenicol, Tetraciclina, Trimetoprim e Sulfametoxazol	50

4.5.4 Confirmação molecular da presença de genes que codificam enzimas ESBL	51
4.5.5 Sequenciamento dos <i>amplicons bla_{TEM}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i>	52
4.5.6 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	52
4.6 SOROTIPAGEM.....	53
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 EMBALAGEM E ROTULAGEM.....	55
5.2 COLIFORMES TERMOTOLERANTES	58
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SP.	59
5.4 PRESENÇA/AUSÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> SP.....	61
5.5 PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SIMILARIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE <i>SALMONELLA</i> SP.	66
5.6 SOROTIPAGEM.....	76
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICES	103
APÊNDICE 1 - <i>CHECK LIST</i> APLICADO NOS RÓTULOS E EMBALAGENS DE CORTES DE FRANGO.....	103

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca mundialmente pela produção e exportação de carne de frango, situando-se na região sul do país os principais estados produtores. No ano de 2016 o Paraná foi responsável por 33% de todo abate de frango no país, se mantendo como maior estado brasileiro produtor de carne de aves. De toda produção nacional, em 2015, foram exportadas 4.304 mil toneladas de produto, quase 60% composto de cortes de frango (ABPA, 2016a). O reconhecimento alcançado pelo país no mercado avícola decorre de avanços contínuos nos métodos de produção, no manejo sanitário dos plantéis e no controle dos processos de abate. *Salmonella* sp. é um dos patógenos de bastante preocupação na produção avícola, sendo alvo de programas de controle desde a criação até o processamento industrial da carne de aves.

Um dos primeiros programas oficiais para controle de *Salmonella* sp. na avicultura brasileira foi apresentado em 1994, por meio da Portaria nº 193 (BRASIL, 1994). Essa portaria instituiu o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), com a função de implantar estratégias de combate e erradicação das principais doenças das aves, como Doença de Newcastle, Influenza Aviária, micoplasmoses e salmoneloses. *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium foram os sorotipos alvos desse programa (BRASIL, 2003a).

Além das medidas de controle impostas na criação das aves, medidas para monitorar esse importante patógeno nos produtos avícolas produzidos também são adotadas no Brasil. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 2003, por meio da Instrução Normativa nº 70, o “Programa de Redução de Patógenos (PRP) – monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus” (BRASIL, 2003b). O objetivo do PRP é garantir a redução gradual da prevalência de *Salmonella* spp., e isso é realizado por meio do monitoramento constante dos lotes de aves que são abatidos e das carcaças obtidas imediatamente após o abate. Esse monitoramento possibilita a identificação das indústrias com prevalência elevada e a tomada de ações mandatórias de impacto, objetivando garantir os limites aceitáveis de contaminação. Como limites aceitáveis, o PRP determina que 12 carcaças possam ser positivas para *Salmonella* sp., num ciclo amostral de 51 carcaças. Em 2016 esse programa foi alvo de algumas

modificações, instituídas por meio da Instrução Normativa nº 20, as quais já estão em vigor desde 21 de outubro de 2016, porém os estabelecimentos ainda têm 120 dias, contados a partir dessa data, para se adequarem (BRASIL, 2016a).

Espera-se que, passados 13 anos desde a implantação desses programas tenha ocorrido redução nos índices de ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de aves abatidas no Brasil. Entretanto, os dados de prevalência obtidos pelo PRP, na qualidade de um monitoramento oficial, não são divulgados frequentemente, impossibilitando acompanhar a efetividade do programa na redução desse patógeno em carcaças de aves e, conseqüentemente, na redução da exposição da população a esse micro-organismo. Deste modo, cabe aos laboratórios de pesquisa monitorar constantemente a ocorrência de *Salmonella* sp. em carne de aves, realizando um mapeamento epidemiológico de amostras comerciais, a fim de avaliar, indiretamente, a efetividade do PNSA e do PRP.

No Brasil, a análise laboratorial padrão para verificação de *Salmonella* sp. nos produtos avícolas é realizada qualitativamente, através da presença/ausência desse patógeno em 25g da amostra analisada. Entretanto, sabe-se que o potencial de um micro-organismo patogênico em causar doença em quem o consome é dependente do micro-organismo, da quantidade consumida do alimento e do *status* imunitário do comensal. Por esse motivo, além da constatação da presença do micro-organismo patogênico, saber a quantidade de células presentes é muito importante na verificação da inocuidade do alimento.

Os protocolos analíticos para enumeração de *Salmonella* sp. em alimentos são laboriosos e possuem custo elevado. Existem poucos métodos reconhecidos internacionalmente para essa finalidade, um deles é a técnica de mNMP (Número Mais Provável Miniaturizado). Essa metodologia foi oficializada pela ISO 6579-2:2012 (ISO/TS, 2012) e se caracteriza por ser uma alternativa confiável, de baixo custo e menos trabalhosa quando comparada com outras metodologias de quantificação.

Apesar do destaque produtivo do Paraná e da grande relevância de *Salmonella* sp. para a cadeia avícola e para a indústria de alimentos, trabalhos avaliando as características e a frequência de ocorrência de sorotipos de *Salmonella* sp. em cortes de frango no estado são raros (TRAINOTTI et al., 2013).

Além das medidas de controle estabelecidas para patógenos dentro do processamento industrial, o correto acondicionamento (embalagem) dos produtos

avícolas prontos para venda, assume grande relevância no tocante à contaminação microbiológica. As indústrias devem atender a várias regulamentações específicas quanto à rotulagem de produtos avícolas, buscando sempre o esclarecimento do consumidor sobre a forma correta de conservação, manipulação e elaboração da carne de aves, com foco principal em evitar a ocorrência de contaminação cruzada e surtos alimentares provocados por *Salmonella* sp. Além dos rótulos, as embalagens também devem ser alvo de monitoramentos constantes pela indústria, evitando que falhas nas linhas produtivas causem danos às mesmas, como rasgos, aberturas da selagem ou furos. Essas violações podem comprometer a qualidade microbiológica do produto antes deste chegar ao consumidor.

A avaliação das rotulagens e embalagens de cortes de frangos congelados permite verificar o atendimento às normas legais, por parte do estabelecimento industrial. Adicionalmente, a observação de violações nas embalagens evidencia falhas durante a produção ou acondicionamento dos produtos nos estabelecimentos varejistas. No Brasil, os trabalhos realizados com foco na avaliação de embalagens e rotulagens de carne de aves possuem mais de dez anos, sendo fundamental uma atualização sobre o assunto (BASTOS et al., 2008; RISTORI et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de *Salmonella* sp. em amostras de cortes de frangos congelados produzidos no Estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a adequação dos rótulos e a integridade das embalagens de cortes de frango quanto ao atendimento às legislações específicas.

Verificar a presença/ausência de *Salmonella* sp. e quantificar coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. nas amostras de cortes de frango.

Realizar análises moleculares nos isolados encontrados para confirmar o gênero *Salmonella* sp.

Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* sp. e verificar fenotipicamente se esses isolados apresentam enzimas Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL).

Confirmar a presença de genes que codificam enzimas ESBL, por meio da pesquisa dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}, *ampC* e *bla*_{TEM}, e sequenciar os genes quando presentes.

Avaliar a similaridade genética existente entre os isolados de *Salmonella* sp., por meio de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

Caracterizar sorologicamente os isolados de *Salmonella* sp. com base no esquema de Kauffmann-White.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUÇÃO PARANAENSE DE CARNE DE FRANGO

O estado do Paraná é o principal responsável pela produção e abate de aves no país. Sua contribuição na produção avícola, que era de 26% em 2006, chegou a representar 33% em 2016. No ranking dos maiores produtores ainda estão os outros dois estados da região sul, com Santa Catarina ocupando o segundo lugar (16%) e Rio Grande do Sul o terceiro (14%) (ABPA, 2016b; SINDIAVIPAR, 2016a).

Historicamente, o primeiro registro sobre instalação de uma indústria avícola no Paraná ocorreu em 1960, na cidade de Rolândia. Nas décadas de 1970 e 1980 outras dez empresas surgiram no estado, entretanto a maior expansão ocorreu nas duas décadas seguintes, quando foram criadas 15 agroindústrias de frango. Atualmente, segundo dados do Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná, existem 35 estabelecimentos que abatem frangos no Paraná submetidos ao Serviço de Inspeção Federal (SIF) (SINDIAVIPAR, 2014; VEIGA e ALIEVI, 2012).

O notável e expressivo crescimento da produção avícola paranaense na primeira década de 2000 foi impulsionado pela conjunção de vários fatores, como a organização associativa e cooperativa do setor industrial avícola de corte, empreendedorismo da indústria avícola, celeiro de produção de grãos, avicultura familiar, crescimento das exportações, infraestrutura logística, qualificação dos produtores e capacitação do corpo técnico (SILVA, 2008).

Desde a implantação da primeira unidade processadora no estado, o volume de abate vem apresentando incrementos anuais. Em 2015 foram abatidas 1,68 bilhão de aves, um aumento de 7,3% em comparação com o ano anterior. Nesse mesmo ano, aproximadamente 67% da produção foi destinada ao consumo interno e 33% ao mercado externo (ABPA, 2016b; AVICULTURA INDUSTRIAL, 2016).

Além da ascensão em produção, a exportação da carne de aves produzida no Paraná também se eleva ano após ano. Só em 2014 houve um aumento de 12,5% no volume de exportação em comparação com 2013, sendo embarcadas 1,28 milhão de toneladas, o que correspondeu a um terço de todo frango exportado pelo Brasil (SINDIAVIPAR, 2015a). Até novembro de 2016 já havia sido registrado um novo aumento, de 3% em relação ao volume exportado no mesmo período do ano

anterior (ABPA, 2016a). A produção de frango paranaense tem mais de 150 países como destino, mas os principais mercados consumidores são Arábia Saudita, China, Japão, Emirados Árabes e Hong Kong. E os principais produtos exportados são os cortes de frango congelados e o frango inteiro congelado (ABPA, 2016b; SINDIAVIPAR, 2016b).

A produção industrial de frangos de corte distribui-se por quase todas as regiões do estado. O principal destaque é a região Oeste, que respondeu por 33% da produção paranaense em 2013, seguida pelas regiões Sudoeste e Norte Central, com participações de 21% e 20%, respectivamente (COASUL, 2013).

3.2 EMBALAGEM E ROTULAGEM DE CARNE DE AVES

A rotulagem e a embalagem possuem papel importante na apresentação, no esclarecimento ao consumidor e na manutenção da integridade do alimento. Segundo a Instrução Normativa nº 22, embalagem é o recipiente ou pacote destinado a garantir a conservação e facilitar o transporte e manuseio dos produtos de origem animal. Já a rotulagem ou rótulo é toda inscrição, legenda ou imagem impressa ou colada sobre a embalagem do produto de origem animal (BRASIL, 2003c).

No Brasil, algumas determinações legais devem ser seguidas quanto à embalagem e rotulagem de produtos avícolas. Uma dessas determinações, imposta pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é a Resolução RDC nº 13 (BRASIL, 2001b). Ela determina que as indústrias produtoras de carne de aves devam incluir na rotulagem de seus produtos instruções de uso, preparo e conservação. Nessa Resolução merece destaque a recomendação de manter produtos crus separados de outros alimentos. Essa prática tem como finalidade impedir a contaminação cruzada por *Salmonella* sp., decorrente do contato de produtos crus com alimentos que não serão submetidos a tratamento térmico antes do consumo. Outra importante recomendação é o cozimento adequado da carne de aves.

O tratamento térmico é crucial para que ocorra a inativação térmica de *Salmonella* sp. na carne de aves, sendo necessário no mínimo 58°C por pelo menos 7 minutos para a redução de um ciclo logarítmico na curva de desenvolvimento do patógeno (JUNEJA et al., 2001). Além da combinação tempo-temperatura,

largamente difundida, outras práticas também podem ser seguidas, como a recomendação dada pela RDC nº 216, da ANVISA (BRASIL, 2004). Ela estabelece que para o cozimento e a segurança do consumidor, alimentos submetidos ao tratamento térmico devem atingir 70°C no interior do produto. Todas essas recomendações tornam-se importantes uma vez que inexistem medidas efetivas para garantir a eliminação de *Salmonella* sp. nos plantéis de aves e, conseqüentemente, nos produtos de origem avícola.

Além da RDC nº 13, outros dispositivos legais também asseguram a qualidade dos produtos e a segurança do consumidor quanto ao fator embalagem. De maneira genérica, o Código de Defesa do Consumidor (BRASIL, 1990) determina que as empresas devem seguir os padrões de qualidade e as especificações de quantidade expressos nos rótulos de seus produtos, e que violações a esses padrões tornam o produto impróprio ou inadequado ao consumo.

Já a Instrução Normativa nº 22 (BRASIL, 2005), específica para produtos de origem animal, regulamenta a presença obrigatória de alguns dizeres na rotulagem desses produtos. Segundo essa legislação, são informações obrigatórias, entre outras, a denominação de venda do produto de origem animal, conteúdo líquido, identificação de origem (nome, endereço, Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica, carimbo do SIF e categoria oficial do estabelecimento), identificação de lote, data de fabricação e de validade, instruções sobre conservação e composição do produto.

Adicionalmente, a Resolução RDC nº 360 (BRASIL, 2003c) institui a obrigatoriedade de constar a informação nutricional no rótulo de carnes *in natura*, quando estas forem embaladas na indústria. A Fiscalização quanto ao atendimento de todas essas normas é competência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e também do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

No Brasil, o número de trabalhos sobre irregularidades em embalagens e rotulagens de carne de aves é reduzido (BASTOS et al., 2008; RISTORI et al., 2008). A maioria dos trabalhos envolvendo a rotulagem de produtos de origem animal não aborda o segmento cárneo, restringindo-se a produtos lácteos e alimentos destinados a grupos específicos, como crianças ou gestantes, por exemplo (PIMENTEL et al., 2002; SMITH; ALMEIDA-MURADIAN, 2011).

3.3 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL

Vários micro-organismos indicadores podem ser utilizados para avaliar o nível de higiene durante o processo de abate de aves, principalmente o grupo dos coliformes totais, enterobactérias e aeróbios mesófilos. Já para avaliar a presença de contaminação fecal, a mensuração do grupo dos coliformes termotolerantes é mais efetiva.

Para ser considerado ideal, um indicador de contaminação fecal deve, entre outras características, ser componente normal da microbiota intestinal de animais saudáveis, estar presente sempre que o patógeno estiver presente, estar em quantidade maior que o patógeno nas fezes e ser fácil de detectar e quantificar (BONDE, 1966).

No Brasil, a RDC nº 12 determina como único parâmetro microbiológico a ser avaliado em carne de aves *in natura* a contagem de coliformes termotolerantes, não devendo essa ultrapassar 10^4 UFC ou NMP/g de alimento analisado (BRASIL, 2001a).

Os coliformes termotolerantes são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5-45,5°C. Esse grupo inclui três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* podem ter origem não fecal, entretanto, cepas de *E. coli* habitam preferencialmente o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, sendo por isso, bons indicadores de contaminação fecal (SILVA et al., 2001).

A presença desses micro-organismos indica condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. Contagens muito elevadas podem significar contaminação pós-processamento e deficiência nas etapas de limpeza e sanitização (MESQUITA et al., 2006). Além disso, sua presença nos alimentos, em níveis altos, pode ser correlacionada com a presença de patógenos entéricos (GHAFIR et al., 2008).

3.2 *SALMONELLA* SP.

3.4.1 Aspectos gerais

O primeiro relato da ocorrência dos micro-organismos que depois viriam a ser chamados de *Salmonella*, foi em 1880, quando Eberth observou pela primeira vez um bacilo tifoide em linfonodos mesentéricos e baço de pacientes que morreram

com sintomas de febre tifoide. A designação “*Salmonella*” foi adotada somente em 1900, derivando seu nome de uma homenagem a Daniel Elmer Salmon, responsável pelo isolamento do micro-organismo conhecido como *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis de suínos. Desde então, várias alterações na nomenclatura do gênero *Salmonella* foram propostas. A partir de 1920, um grupo de microbiologistas, liderados por Fritz Kauffmann, em Copenhague, e por Philip Bruce White, em Londres, unificou a taxonomia do gênero. Em 1933, o trabalho desses pesquisadores foi reconhecido pelo subcomitê de *Salmonella* spp., da Sociedade Internacional de Microbiologia, como esquema de Kauffmann-White (POPOFF; LE MINOR, 2005; MARINELI et al., 2013).

Em sua primeira publicação, em 1934, o esquema de Kauffman-White listou 44 sorotipos de *Salmonella* spp. Trinta anos depois, em 1964, com auxílio de Leon Le Minor, pesquisador do Instituto Pasteur, o esquema possuía 958 sorotipos e, atualmente conta com 2.659 sorotipos descritos. Devido a grande contribuição de Le Minor na publicação da maioria dos sorotipos conhecidos hoje, o esquema antes denominado somente “Kauffmann-White” passou também a ser conhecido como “esquema de Kauffmann-White-Le Minor”, sendo esta nomenclatura menos difundida (SALMONELLA SUBCOMMITTEE, 1934; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

Atualmente o gênero *Salmonella* spp. é constituído por duas espécies distintas: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* apresenta seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) e *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (TABELA 1). *Salmonella bongori* foi inicialmente descrita como *S. enterica* subespécie V. Apesar de já ter sido verificado se tratar de outra espécie de *Salmonella*, algumas vezes, por conveniência, ainda é referida como subespécie V (TINDALL et al., 2005; GRIMONT; WEILL, 2007).

Salmonella enterica subespécie *enterica* compreende 1.586 sorotipos e é a única subespécie que contém patógenos que acometem humanos e animais (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Epidemiologicamente é a subespécie mais relevante, pois os animais utilizados para consumo humano podem servir como veículo de sorotipos patogênicos ao homem, apesar daqueles não necessariamente desenvolverem doença (KINGSLEY; BÄUMLER, 2000).

TABELA 1 - NÚMERO DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA* EM CADA ESPÉCIE E SUBESPÉCIE.

	<i>Salmonella</i> spp.	Número de sorotipos
<i>Salmonella enterica</i>		
I	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1586
II	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	522
IIIa	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	102
IIIb	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	338
IV	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	76
VI	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>		22
Total (gênero <i>Salmonella</i>)		2659

FONTE: Adaptado de Issenhuth-Jeanjean et al. (2014)

Do ponto de vista clínico, a divisão dos sorotipos em grupos, de acordo com a patologia causada, tem mais utilidade. Sendo assim, dois grandes grupos podem ser considerados: *Salmonellas* tifoparatíficas (*Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A, B e C) e *Salmonellas* gastroentéricas (principalmente *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Infantis e Choleraesuis) (VÁZQUEZ et al., 2014).

A distinção entre os sorotipos de *Salmonella* é realizada com o uso de antissoros para dois antígenos de superfície principais, o antígeno O e o antígeno H, os quais apresentam alta variabilidade. Estes antígenos apresentam 46 e 114 formas antigênicas, respectivamente, sendo essa diversidade responsável pela designação dos mais de 2.600 sorotipos de *Salmonella* existentes e pela descrição frequente de novos (MCQUISTON et al., 2004; GRIMONT; WEILL, 2007). Constantemente novas fórmulas antigênicas são definidas pelo Centro de Pesquisa e Referência sobre *Salmonella* spp., do Instituto Pasteur na França, em colaboração com a Organização Mundial da Saúde. Esses novos sorotipos são listados nas atualizações anuais do esquema Kauffmann-White.

O antígeno O é um polissacarídeo que compõe a membrana celular. Ele é um polímero de subunidades O e é geralmente composto por 4 ou 6 açúcares. As diferenças antigênicas são decorrentes dos diferentes açúcares que compõem a subunidade O, da natureza das ligações covalentes entre os açúcares e da natureza das ligações entre as subunidades que formam o polímero O (CDC, 2011).

O antígeno H é uma porção filamentosa do flagelo bacteriano, constituído de subunidades proteicas denominadas flagelinas. As porções N e C terminais da flagelina, as quais conferem a estrutura filamentosa característica, são conservadas. A região antigenicamente variável da flagelina é a porção mediana a qual fica exposta na superfície do flagelo. Geralmente, apenas um antígeno flagelar é

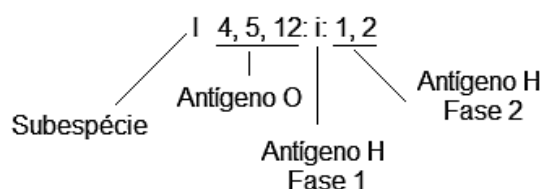
expresso por vez numa célula bacteriana, sendo essa chamada de monofásica. *Salmonella* spp. é a única bactéria entérica que pode expressar dois diferentes antígenos flagelares, de fase 1 e de fase 2. Entretanto, dentro do gênero *Salmonella* spp. alguns sorotipos podem também apresentar-se monofásicas, seja pela redução ou perda da expressão do gene da flagelina ou de forma natural, como ocorre em *S. Enteritidis* e *S. Typhi* (GRIMONT; WEILL, 2007; CDC, 2011).

Cepas de *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin*, além dos antígenos O e H, podem apresentar antígenos capsulares (Vi). A composição do antígeno de superfície Vi é basicamente polissacarídica, e as cepas que o possuem são mais virulentas quando comparadas as cepas onde esse antígeno é inexistente (ISO/TS, 2012).

Além da forma escrita tradicional, os diferentes sorotipos de *Salmonella* também podem ser representados por meio de fórmulas antigênicas. A forma típica de fazer essa representação é (CDC, 2011):

Subespécie (espaço) Antígeno O (dois pontos) Antígeno H de fase 1 (dois pontos) Antígeno H de fase 2

O esquema a seguir representa a fórmula antigênica correspondente a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium.



As bactérias do gênero *Salmonella* são hospedeiras intestinais de vertebrados e geralmente são transmitidas ao homem pelo consumo de alimentos contaminados. Elas pertencem à Família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram-negativos, anaeróbias facultativas, não esporulam e formam colônias com 2-4mm de diâmetro (INTERNATIONL BULLETIN, 1954; ISO/TS, 2012; INSTITUTO PASTEUR, 2013). Com exceção dos sorovares Pullorum e Gallinarum, são móveis, devido à presença de flagelos peritríquios (POPOFF; LE MINOR, 2005).

3.4.2 Relevância para saúde pública

Estima-se que a incidência global de gastroenterite causada por *Salmonella* não-tifoide seja cerca de 93,8 milhões de casos por ano, com 155 mil mortes (MAJOWICZ et al., 2010). *Salmonella* sp. é o principal agente envolvido em surtos de origem alimentar no Brasil, na Europa e nos Estados Unidos (EUA) (CDC, 2014b; BRASIL, 2015a; EFSA, 2015a).

Dados do Ministério da Saúde mostram que só no ano de 2015 foram identificados 673 surtos de origem alimentar no Brasil (BRASIL, 2016b). Considerando a série histórica entre os anos 2000 e 2015, foram notificados 10.666 surtos, com 155 óbitos. Devido à pobre notificação de casos e a falhas nos mecanismos epidemiológicos de investigação, 58% dos agentes etiológicos envolvidos nesses surtos não foram identificados. Dentre os micro-organismos que foram caracterizados, *Salmonella* sp. aparece como o principal agente, reportado em 14,4% dos surtos (BRASIL, 2015a).

Estima-se que 86% a 95% do total de casos de salmonelose sejam decorrentes do consumo de alimentos contaminados (MEAD et al., 1999). Uma grande variedade de alimentos de origem animal pode atuar como fonte de contaminação humana por *Salmonella* sp., incluindo a carne de aves, que assume grande relevância devido às condições de manejo e abate das aves, possibilitando a ocorrência desse patógeno desde etapas iniciais de criação até o produto final (SANTOS et al., 2000; ROCHA et al., 2003; TESSARI et al., 2003; GREIG; RAVEL, 2009).

Aves que chegam ao ambiente de criação livres de *Salmonella* sp. podem adquirir o patógeno pelo consumo de ração ou água contaminada (HOFER et al., 1998). Além disso, falhas nos procedimentos de biossegurança podem permitir a entrada de vetores, como insetos, roedores e outros animais, os quais funcionam como transmissores de *Salmonella* sp. para as aves e também auxiliam na perpetuação desse patógeno no ambiente de criação (FERNANDES et al., 1992; HENZLER; OPITZ, 1992; RIEMANN et al., 2000).

Dentro da linha de produção, a carne de aves pode se contaminar com *Salmonella* sp. não somente por meio da ave que chega infectada, mas também pela contaminação cruzada com fezes, água, equipamentos e manipuladores, durante o abate, escaldagem, depenagem e manipulação dos produtos cárneos, especialmente quando condições de higiene não são adequadamente respeitadas (SAEED et al., 2013).

Os primeiros surtos envolvendo *Salmonella* foram relatados na década de 1970, porém foi nos anos 1980 que se observou um aumento considerável nos surtos de salmonelose humana em todo o mundo, especialmente causados pelo consumo de ovos contendo o sorotipo Enteritidis (SILVA; DUARTE, 2002; NEWELL et al., 2010).

No Brasil, o primeiro surto envolvendo *S. Enteritidis* foi descrito em 1981 em Curitiba (PR), porém, até 1990, esse sorotipo raramente era descrito como causador de infecções humanas. A partir de 1993, *S. Enteritidis* emergiu como um grande problema de saúde pública e, em 1995 já era responsável por mais de 60% dos sorotipos isolados no Instituto Adolfo Lutz (MOTA et al., 1983; SILVA; DUARTE, 2002). Há fortes indícios de que essa explosão tenha ocorrido devido à importação de material genético avícola contaminado com *S. Enteritidis*, ocorrida no final da década de 1980, vindo inicialmente dos EUA e em seguida da Europa (SILVA; DUARTE, 2002).

Alguns trabalhos mostram que o sorotipo Enteritidis foi o mais comumente encontrado em carne de aves abatidas no Brasil até a primeira década dos anos 2000, sendo depois substituído por outros sorotipos (SANTOS et al., 2000; REZENDE et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007; DUARTE et al., 2009; CARDOSO et al., 2015; PALMEIRA et al., 2016). A elevada prevalência de *S. Enteritidis* em carne de aves nesse período contribuiu para que esse sorotipo fosse o mais isolado em infecções humanas. No Paraná, entre 1999 e 2008, foram contabilizados 2.027 casos de salmonelose, com 881 hospitalizações. *S. Enteritidis* foi o sorotipo predominante isolado de pacientes (88%) e alimentos (80%) (KOTTWITZ et al., 2010).

Salmonella Enteritidis também aparece como sorotipo predominante isolado em casos humanos na União Europeia (UE) e nos EUA. Na União Europeia, *S. Enteritidis* foi isolada em 39,5% dos casos de salmonelose humana no ano de 2013, e *S. Typhimurium* em 20,2% (EFSA, 2015a). Nos Estados Unidos, dados do Food Tool (Foodborne Outbreak Online Database) mostram que entre 2014 e 2015, ocorreram 27 surtos de salmonelose envolvendo carne de frango e produtos que continham carne de frango. Ao todo foram isolados 13 diferentes sorotipos, com predominância de *Salmonella* Enteritidis, identificada em 13 surtos (CDC, 2016). Apesar da predominância do sorotipo Enteritidis nos surtos americanos envolvendo carne de aves, os dados do Programa de Redução de Patógenos Americano (PR/HACCP) mostram que em 2014, o sorotipo mais isolado em carne de frango não

foi *S. Enteritidis*, mas sim *S. Kentucky*, identificada em 43% das amostras. *S. Enteritidis* foi o segundo sorotipo mais isolado, estando presente em 9,5% das amostras, seguido pelos sorotipos Montevideo e Typhimurium (CDC, 2014a).

As gastroenterites humanas causadas por *Salmonella* sp. variam de leves a graves, podendo ser fatais (CDC, 2011). A intensidade da sintomatologia clínica depende de fatores relacionados ao micro-organismo, como sorotipo e carga bacteriana ingerida, e de fatores relacionados ao indivíduo, como idade, diminuição da acidez gástrica e da motilidade intestinal, alterações na microbiota intestinal normal, diabetes mellitus, enfermidades inflamatórias intestinais e alterações da função dos macrófagos (ABE et al., 2004; VÁZQUEZ et al., 2014).

O período de incubação varia de acordo com os fatores descritos anteriormente, podendo durar de 1 a 2 dias. Em geral, a salmonelose resulta em gastroenterite moderada, a qual se manifesta por febre, diarreia, vômito e dor abdominal. Nas pessoas adultas em condição física normal, a gastroenterite se resolve sem tratamento depois de 3-5 dias, em média (INSTITUTO PASTEUR, 2013). Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, idosos e crianças, infecções sistêmicas, tais como bacteremia e meningite, podem se desenvolver e requerem tratamento antimicrobiano. Além desses pacientes, o tratamento antimicrobiano também pode ser requerido em pacientes com diarreia severa (BATCHELOR et al., 2005).

Um grande desafio que vem sendo enfrentado por todo corpo médico é o aparecimento de cepas de *Salmonella* sp. resistentes às classes clinicamente importantes de quinolonas e cefalosporinas, determinando falhas nos protocolos terapêuticos. Além dos casos humanos, essas cepas resistentes também já foram relatadas em aves e carne de aves, reforçando a problemática desse tipo de alimento frente a transmissão de *Salmonella* sp. (LU et al., 2010; BEYENE et al., 2011; SINGH et al., 2012; YANG et al., 2014a; SODAGARI et al., 2015).

3.4.3 Dose infectante e quantificação de *Salmonella* sp. pela metodologia de Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP)

As metodologias mais difundidas para verificar a presença de *Salmonella* sp. em produtos avícolas são realizadas de forma qualitativa (BAM, 1992; APHA, 2001; ISO, 2007). Entretanto, a quantificação da dose infectante presente em um

alimento torna-se mais importante que a simples detecção, pois se sabe que o risco para saúde humana é baseado, entre outros fatores, na relação quantidade de micro-organismo consumido/resposta imunitária de quem consome. Além disso, variáveis relacionadas ao alimento, como a quantidade de gordura por exemplo, também exercem influência na dose infectante.

O termo dose infectante é comumente entendido como a média do número de micro-organismos necessários para causar doença (JOHNSON, 2003). Para *Salmonella* sp. ainda não existe um consenso sobre a dose infectante para humanos, entretanto acredita-se que a ingestão de 10^5 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Salmonella* sp. seja a dose necessária para o desenvolvimento de doença em pessoas saudáveis (ADAMS; MOTARJEMI, 2002; HUMPHREY, 2004). Já em crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas, doses infectantes entre 10^1 a 10^3 UFC são suficientes para causar doença (POPPE, 1996).

Surtos associados a alimentos gordurosos já demonstraram a necessidade de uma dose infectante baixa, menor que 10 UFC/g em chocolate e menor que 6 UFC/g em hambúrguer. Nos alimentos gordurosos poucas células de *Salmonella* sp. são suficientes para causar doença pois esses alimentos conferem proteção às bactérias frente aos ácidos gástricos, impedindo sua destruição (FONTAINE et al., 1978; GREENWOOD e HOOPER, 1983).

Dentre as metodologias disponíveis para quantificação de *Salmonella* sp. em matrizes alimentares está a técnica do Número Mais Provável (NMP). Essa técnica se baseia em probabilidades estatísticas e possui alguns pontos desfavoráveis para sua aplicação, como a demora para obtenção de resultados, a grande quantidade de vidrarias utilizadas e a grande demanda de mão-de-obra, sendo por isso alvo de modificações (CAVADA et al., 2010).

Uma adaptação da técnica de NMP foi desenvolvida por Fravallo et al. (2003), e denominada de NMP miniaturizado (mNMP), pois utiliza um volume menor de amostra, de material e de mão-de-obra. Essa técnica deve ser realizada em paralelo com a técnica convencional de presença/ausência de *Salmonella* sp, principalmente em matrizes alimentares onde se espera baixa carga contaminante, como na carne de aves, por exemplo. Essa prática é fundamental pois o limite de detecção da técnica de mNMP é aproximadamente 1 NMP/g, enquanto a técnica de presença/ausência possui como limite de detecção 1 UFC/25g, ou seja, 0,04 UFC/g (ISO/TS, 2012).

A importância de realizar conjuntamente as duas técnicas foi demonstrada por Mion et al. (2016). Ao avaliarem a presença de *Salmonella* sp. em 1.071 amostras de campo e da indústria pela metodologia convencional e pela técnica de mNMP, os autores encontraram 9 amostras positivas para o patógeno, sendo cinco detectadas pela microbiologia convencional, três pela técnica de mNMP e somente uma por ambas as técnicas. Da mesma forma, Santos et al. (2015), ao analisarem 108 amostras de diferentes pontos em três matadouros, encontraram *Salmonella* sp. em seis amostras, sendo todas detectadas pela técnica microbiológica convencional, mas somente duas pela técnica de mNMP.

Além do menor limite de detecção da técnica de mNMP, esses resultados podem ser atribuídos também à distribuição heterogênea dos micro-organismos, inclusive *Salmonella* sp., em amostras naturalmente contaminadas (SANTOS et al., 2015).

Apesar desses inconvenientes, o método de mNMP reduz bastante o volume de material e mão-de-obra necessária, o que viabiliza sua utilização como alternativa para estimar a quantidade de células de *Salmonella* sp. em amostras de alimentos.

Por outro lado, o intervalo entre o início da análise e a obtenção dos resultados ainda continua grande (seis dias). Para contornar essa desvantagem, novas metodologias já estão sendo testadas a fim de reduzir o tempo de análise, como a associação da técnica molecular de PCR *Real-Time* (qPCR) ao método de mNMP. Esse mNMP modificado propõem a realização de qPCR para confirmação de *Salmonella* sp. diretamente da placa de MSRV, reduzindo em 48 horas o tempo de análise (SHASHIDHAR et al., 2011).

3.4.4 Mecanismos de resistência a antimicrobianos

O sucesso terapêutico de um antimicrobiano é possível devido a sua toxicidade seletiva, responsável por agir sobre a célula bacteriana mas não sobre a célula animal (QUINN et al., 2010). Essa seleção ocorre devido a diferenças estruturais nas células procarióticas e eucarióticas, destacando-se a existência de um único cromossomo circular, presença de ribossomo 70S e parede celular contendo peptidoglicano nas células bacterianas (BAUMAN, 2009; CALVO; MARTINÉZ-MARTINÉZ, 2009).

Os organismos procariontes podem apresentar resistência intrínseca, resistência adquirida ou sensibilidade aos agentes antimicrobianos. A resistência intrínseca é a resistência natural exibida por todos os exemplares de determinada espécie, como por exemplo, a resistência natural apresentada por bactérias do gênero *Enterococcus* frente às cefalosporinas (WILLIAMSON et al., 1985; MCDERMOTT et al., 2003).

A resistência adquirida é resultado da mutação de genes reguladores ou estruturais, da aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis ou da combinação de ambos os mecanismos. Dessa forma, o fenótipo de resistência adquirida só está presente em determinados indivíduos e não em toda população da mesma espécie (DAVIES, 1997). Algumas práticas que auxiliam no aparecimento de resistência bacteriana são a prescrição exagerada de drogas antimicrobianas na medicina humana, a existência de pacientes que se automedicam e também daqueles que não finalizam os tratamentos e a utilização de doses subterapêuticas em animais de produção (YAH, 2010; WASYL et al., 2012; HUR et al., 2012; KAO et al., 2015; WHO, 2015).

Por outro lado, micro-organismos sensíveis aos antimicrobianos são aqueles nos quais não existe mecanismos de resistência que possibilitem sua sobrevivência na presença de determinados compostos (HARBOTTLE et al., 2006).

Entre os micro-organismos resistentes, existem aqueles chamados de multirresistentes (MR), os quais se caracterizam por apresentar fenótipo resistente a pelo menos três classes antimicrobianas (NGOI; THONG, 2013). Um exemplo de micro-organismo virulento e multirresistente é *Salmonella* Typhimurium DT104, ela se caracteriza por apresentar resistência a Ampicilina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Sulfametoxazol e Tetraciclina. Sua prevalência em infecções humanas nos Estados Unidos saltou de 0,6% em 1979 para 34% em 1996, tornando-se um grande desafio para saúde pública (GLYINN et al., 1998; DECHET et al., 2006).

São descritos basicamente três mecanismos de resistência bacteriana. O mecanismo de resistência mais antigo conhecido é a produção de proteínas específicas, geralmente enzimas, as quais alteram o antimicrobiano, de forma que ele não tenha mais o modo de ação esperado. Um exemplo é a produção de enzimas beta-lactamases por *Salmonella* sp., responsáveis por inativar os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (FOLEY; LYNNE, 2008).

Um segundo mecanismo de resistência são as bombas de efluxo que bombeiam ativamente os antimicrobianos para fora da bactéria, de forma que as concentrações antimicrobianas na célula nunca alcancem o limiar necessário para interferir nos processos metabólicos da mesma (CROFT et al., 2007). A resistência à tetraciclina e ao cloranfenicol em isolados de *Salmonella* sp. são exemplos de bombas de efluxo dependentes de energia. Elas removem esses antimicrobianos da célula bacteriana antes deles exercerem sua ação, de inibição da síntese proteica (MASCARETTI, 2003; FOLEY; LYNNE, 2008).

O terceiro mecanismo de resistência é a modificação química ou mutação do sítio de ligação do antimicrobiano, impedindo que ele se ligue ao alvo. Este mecanismo é observado em *Enterococcus* resistentes à vancomicina, os quais apresentam mutação em alguns peptídeos, levando a diminuição da afinidade por esse antimicrobiano (CROFT et al., 2007).

Com a ocorrência cada vez maior de cepas resistentes, a terapia antimicrobiana nos casos de salmonelose, que por muito tempo consistiu na administração de ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol, precisou sofrer adaptações. Como alternativa, os grupo das fluoroquinolonas (Ciprofloxacina) e das cefalosporinas de terceira geração passaram a ser o tratamento de eleição (DE SOUZA et al., 2010; VÁZQUEZ et al., 2014). Entretanto, a expressão de enzimas Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) já está sendo responsável por falhas terapêuticas associadas a utilização dessas drogas, fazendo com que o único grupo ainda efetivo contra essas bactérias seja os Carbapenêmicos (VARDAKAS et al., 2012).

3.4.4.1 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

A primeira enzima beta-lactamase foi identificada em 1963, numa cepa de *Escherichia coli* isolada de um paciente chamado Temoniera, na Grécia, originando assim o nome da enzima TEM-1. A codificação dessa enzima por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, possibilitou sua rápida disseminação (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965).

Em 1980 foram introduzidas na prática médica as cefalosporinas de terceira geração, as quais possuíam estrutura molecular resistente à ação das enzimas beta-lactamases descritas até então. Entretanto, a pressão de seleção exercida pelo uso

massivo dessas novas drogas levou ao surgimento das enzimas beta-lactamases de espectro estendido. Três anos após o início do uso dessas drogas foi relatada a primeira ESBL, denominada SHV-2 em *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* (KNOTHE et al., 1983). A partir de então, enzimas ESBL foram descritas em todos os continentes. A rápida disseminação de enterobactérias produtoras de ESBL foi resultado da expansão clonal e da transferencial horizontal de genes que codificam ESBL através de elementos genéticos móveis (EUCAST, 2013). Na América Latina o primeiro relato de ESBL foi em 1989, quando foi reportada a presença de SHV-5 em *Klebsiella pneumoniae*, no Chile (GUTMANN et al., 1989).

Até a década de 1990 poucos pesquisadores objetivavam estudar a produção de beta-lactamases por cepas de *Salmonella* spp. A partir dos anos 2000 esses estudos se intensificaram e até hoje continuam trazendo contribuições valiosas ao entendimento desse importante mecanismo de resistência (MULVEY et al., 2003; HASMAN et al., 2005; MORRIS et al., 2006; WASYL; HOSZOWSKI, 2012). O primeiro relato de *Salmonella* sp. produtora de enzima ESBL em pacientes hospitalizados ocorreu na Tunísia, em 1988 (HAMMAMI et al., 1991). Em 1989, essas cepas já haviam se disseminado para a América Latina, onde foi descrita a primeira cepa de *Salmonella* não-tifoide produtora da enzima CTX-M-2 em uma unidade neonatal, na Argentina. A partir de então essas enzimas se espalharam rapidamente para países vizinhos, como Paraguai, Uruguai e Brasil (BAUERNFEIND et al., 1996).

Com a rápida disseminação, cepas de *Salmonella* sp. produtoras de ESBL deixaram de ser isoladas somente em amostras de humanos doentes e passaram a ser relatadas também em animais de produção e, mais tarde, em alimentos de origem animal, principalmente carne de aves, possibilitando sua transferência para humanos por meio do consumo de alimentos com esses micro-organismos (HASMAN et al., 2005; PEIRANO et al., 2006; YANG et al., 2014b).

Noda et al. (2015) relataram um aumento de 0% em 2004 para 28% em 2010 de cepas de *Salmonella* sp. contendo genes que codificam enzimas ESBL, isoladas de produtos avícolas (carne e miúdos) no Japão.

Além da veiculação alimentar, outras causas importantes de disseminação de enzimas ESBL são o acesso deficiente à água potável, a pobreza extrema e a densidade populacional elevada, cenário característico de países em

desenvolvimento. Todos esses fatores são extremamente eficientes na disseminação de qualquer doença que seja de transmissão fecal-oral (WOERTHER et al., 2013). Água contendo enterobactérias produtoras de ESBL já foi descrita no Brasil. No Rio de Janeiro, Chagas et al. (2011), ao analisarem água hospitalar residual, encontraram enterobactérias produtoras de ESBL mesmo após o tratamento dessa água, inclusive com a utilização de cloro.

A produção de ESBL é o principal mecanismo de resistência bacteriana frente aos antimicrobianos da classe dos Beta-lactâmicos. Esses compostos são enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico das penicilinas, cefalosporinas e compostos relacionados, antes deles atingirem as proteínas de ligação, inativando esses antimicrobianos e tornando o tratamento ineficaz (FONZÉ et al., 1995; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009). Por outro lado, essas enzimas não possuem capacidade para hidrolisar cefamicinas e carbapenêmicos, grupos de antimicrobianos também pertencentes a classe dos beta-lactâmicos.

Existe uma grande variedade de enzimas ESBL, a maioria delas são adquiridas e codificadas por genes plasmidiais. Essas ESBL adquiridas podem ser expressas em vários níveis, diferindo em sua atividade contra agentes beta-lactâmicos específicos. Além do nível de expressão, as propriedades de uma enzima e a presença de outros mecanismos de resistência são também responsáveis pela grande variedade de fenótipos de resistência observados entre os isolados produtores de ESBL (EUCAST, 2013).

Em *Salmonella* spp. já foram descritas várias enzimas ESBL, sendo os tipos TEM, SHV, CTX-M, CMY e OXA os mais comuns e de maior relevância epidemiológica (WINOKUR et al., 2001; HASMAN et al., 2005; ARLET et al., 2006; ZHAO et al., 2009). Outro grupo de enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas são as beta-lactamases do tipo AmpC, as quais são resistentes aos inibidores clavulanato, sulbactam e tazobactam, não sendo, por esse motivo, classificadas como ESBL. As enzimas AmpC, juntamente com as ESBL estão sendo cada vez mais relatadas em *Salmonella* spp., comprometendo seriamente o uso de beta-lactâmicos e se tornando um sério problema de saúde pública (BATCHELOR et al., 2005; KEELARA; THAKUR, 2014).

3.4.5 Medidas de controle

No Brasil, medidas específicas para o controle de *Salmonella* sp. na avicultura foram impostas pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) e pelo Programa de Redução de Patógenos (PRP). Esses programas estabelecem medidas de erradicação de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, importantes para saúde animal, e de controle e monitoramento, de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, de grande relevância para saúde pública. Essas ações visam reduzir o número de aves portadoras de *Salmonella* sp. que chegam ao abate, uma vez que aves livres de *Salmonella* sp. têm uma maior probabilidade de produzirem carcaças livres ao final do abate.

O PNSA, por meio da Instrução Normativa nº 78, estabelece a erradicação como estratégia de controle de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* nos plantéis avícolas. Para isso, matrizes positivas para esses sorotipos devem ser sacrificadas. Adicionalmente, essa Instrução Normativa (IN) estabelece também a imunização de matrizes, com vacina inativada, contra *S. Enteritidis* (BRASIL, 2003a).

Já o PRP, instituído pela Instrução Normativa nº 70, estabelece a análise laboratorial sistemática e contínua de carcaças de frangos e perus *in natura*, para pesquisa de *Salmonella* spp. A principal função desse monitoramento microbiológico é construir um sistema de informações para avaliação da contaminação dos produtos examinados, viabilizando a determinação do nível adequado de proteção ao agente, o que permite a melhor eficiência das medidas de controle, como componente importante da Análise de Risco Microbiológico (BRASIL, 2003b).

O PRP determina que sejam analisadas 51 carcaças por ciclo amostral, coletadas após o sistema de resfriamento, podendo ocorrer a presença de *Salmonella* sp. no máximo em 12 carcaças. O intervalo de tempo necessário para completar um ciclo amostral é dependente do volume de abate, dessa forma, estabelecimentos que abatem mais aves por dia, completam o ciclo antes. As análises microbiológicas para pesquisa de *Salmonella* sp. nas carcaças são divididas em “análises de rotina”, realizadas em laboratórios reconhecidos ou credenciados, e “análises de supervisão”, realizadas semanalmente em laboratórios oficiais.

Em 21 de outubro de 2016, foi instituída a Instrução Normativa nº 20 com a missão de substituir a IN nº 70. Ela traz algumas modificações relacionadas ao ciclo amostral e aos laboratórios onde as amostras serão analisadas. Apesar de já estar

em vigor, os estabelecimentos ainda têm 120 dias, contados a partir de 21 de outubro de 2016, para se adequarem (BRASIL, 2016a).

Os dados oficiais obtidos pelo PRP não são disponibilizados periodicamente para consulta da população em geral. Desde a implantação do programa, a única divulgação oficial é uma Nota Técnica, emitida em 2010 pelo Grupo Técnico de Trabalho responsável por analisar os dados e revisar a IN nº 70. Essa Nota Técnica relata uma prevalência de *Salmonella* sp. de 6,4%, obtida por meio da análise de 128.293 carcaças de aves entre 2003 e 2008 (BRASIL, 2010).

O PRP brasileiro é muito semelhante ao Programa de Redução de Patógenos Americano (PR/HACCP), implantado em 1996. Inicialmente, o modelo amostral do PR/HACCP era idêntico ao utilizado hoje pelo Brasil. Porém, em 2011, as diretrizes para amostragem mudaram, atualmente são analisadas 51 carcaças e somente cinco podem ser positivas para *Salmonella* sp. Para cortes de frango são admitidas oito amostras com presença do patógeno. Assim como os dados apresentados pelo PRP brasileiro, o PR/HACCP também mostra baixa prevalência, com 7,2% das carcaças positivas para *Salmonella* sp. em 2009 (FINSTAD et al., 2012; USDA/FSIS, 2013).

Como a divulgação dos dados obtidos pelo PRP brasileiro ocorre de forma muito rara, vários trabalhos são continuamente realizados por instituições de pesquisa, objetivando o monitoramento constante da ocorrência de *Salmonella* sp. em carne de aves. Na TABELA 2 é possível observar alguns desses trabalhos, com frequências de ocorrência de *Salmonella* sp. variando de zero até 60% em carcaças e de zero até 71,7% em cortes de frango.

Chama a atenção o fato de que percentuais baixos de ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frango foram relatados antes mesmo da implantação dos programas de controle (NUNES et al., 1995; COSTA et al., 1997; CARDOSO et al., 2000). Da mesma forma que percentuais muito elevados, de 50% e 60%, foram relatados após o PNSA e o PRP já estarem em vigor (TIROLLI; COSTA, 2006; RALL et al., 2009; YAMATOIGI et al., 2012). Isso provavelmente é reflexo de diferenças geográficas e sazonais, dos diversos métodos analíticos utilizados, da forma de conservação do produto analisado e das condições higiênicas adotadas em cada estabelecimento produtor de onde as amostras foram obtidas.

TABELA 2 - FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* SP. EM CARÇAÇAS E CORTES DE FRANGO EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.

PRODUTO	ESTADO/REGIÃO DO BRASIL	FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> SP. (%)	REFERÊNCIA
Carçaça	São Paulo	0	Cardoso et al. (2000)
	Rio Grande do Sul	2,2	Brizio et al. (2014)
	São Paulo	2,5	Tessari et al. (2008)
	15 cidades	2,7	Medeiros et al. (2011)
	Minas Gerais	3,3	Cossi et al. (2012)
	São Paulo	5,9	Matheus et al. (2003)
	Brasil todo	6,4	Brasil (2010)
	Minas Gerais	6,6	Matias et al. (2010)
	Rio de Janeiro	6,7	Panzenhagen et al. (2016)
	São Paulo	8,3	Costa et al. (1997)
	Goiás	9,1	Nunes et al. (1995)
	Nordeste	9,6	Duarte et al. (2009)
	São Paulo	12,8	Cardoso et al. (2014)
	São Paulo	13,3	Carvalho; Cortez (2005)
	São Paulo	13,9	Ristori et al. (2008)
	Goiás	14,3	Moreira et al. (2008)
	São Paulo	14,6	Cardoso et al. (2015)
	Goiás	19,8	Rezende et al. (2005)
	São Paulo	20,7	Cardoso et al. (2005)
	São Paulo	32	Santos et al. (2000)
	São Paulo	42	Fuzihara et al. (2000)
	Amazonas	50	Tirolli; Costa (2006)
	São Paulo	50	Hoffmann et al. (2002)
	São Paulo	54	Rall et al. (2009)
	São Paulo	60	Yamatogi et al. (2012)
Cortes	São Paulo	0	Cardoso et al. (2000)
	Paraná	0	Trainotti et al. (2013)
	Rio Grande do Sul	10,5	Bau et al. (2001)
	São Paulo	11,5	Cardoso et al. (2005)
	Rio Grande do Norte	18	Fernandes et al. (2016)
	Goiás	20,9	Nunes et al. (1995)
	São Paulo	22,9	Carvalho; Cortez (2005)
	Rio Grande do Norte	26	Fernandes et al. (2016)
	São Paulo	35	Costa et al. (1997)
	Sul	39,3	Ribeiro et al. (2007)
	São Paulo	40	Carvalho; Cortez (2003)
	Paraíba	71,7	Silva et al. (2002)

FONTE: A autora (2017)

Após a implantação do PNSA e do PRP, acredita-se que efetivamente esteja ocorrendo redução na ocorrência de *Salmonella* sp. em carne de frango produzida pelo Brasil. Entretanto, a dimensão dessa redução pode estar sendo superestimada

nos dados do PRP, já que as carcaças analisadas para compor os dados desse programa são coletadas pela própria indústria processadora, permitindo desvios.

Os cortes de frango podem sofrer um incremento na contaminação por *Salmonella* sp. devido ao fato de serem mais manipulados, estando assim mais predispostos a sofrer contaminação cruzada durante o processamento tecnológico quando comparados às carcaças (NUNES et al., 1995; COSTA et al., 1997; UYTENDAELE et al., 1998; KOZACINSKI et al., 2006). Costa et al. (1997) observaram uma variação bastante grande ao analisarem 60 amostras de carcaças e 45 de cortes de aves e encontrarem 8,3% das carcaças e 35% dos cortes positivos para *Salmonella* sp.

Além da maior manipulação, outro fator importante que pode incrementar a presença de *Salmonella* sp. em cortes de frango é o tratamento das carcaças submetidas ao aproveitamento condicional. Carcaças que apresentam contaminação gastrointestinal visível ou alguma lesão, que não determine sua condenação total, são submetidas a remoção da parte contaminada ou lesada e destinadas à produção de cortes. Esses cortes são processados separadamente das carcaças inteiras, possuindo um sistema de resfriamento (*chiller*) exclusivo, durante o qual a contaminação gastrointestinal não visível, não removida nas linhas de inspeção, pode se espalhar, ocasionando uma maior contaminação por *Salmonella* sp. nesses produtos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

As amostras analisadas neste trabalho foram cortes de frango congelados (asa, perna, peito e frango a passarinho), nas apresentações bandeja, congelados individualmente (IQF) ou congelados em bloco (pacote). Todos os cortes foram provenientes de matadouros submetidos ao Serviço de Inspeção Federal (SIF), localizados no estado do Paraná e adquiridos entre agosto de 2015 e fevereiro de 2016.

O número de amostras coletadas foi calculado com base em uma prevalência esperada de *Salmonella* sp. em carne de frango de 25%, segundo a fórmula (FAO, 1998):

$$N = \frac{p \cdot q \cdot Z^2}{E^2}$$

Onde:

p (prevalência esperada) = 25

q (100 - prevalência esperada) = 75

Z (valor, a partir da distribuição normal, para o nível de confiança de 95%) = 1,96

E (precisão desejada) = 5

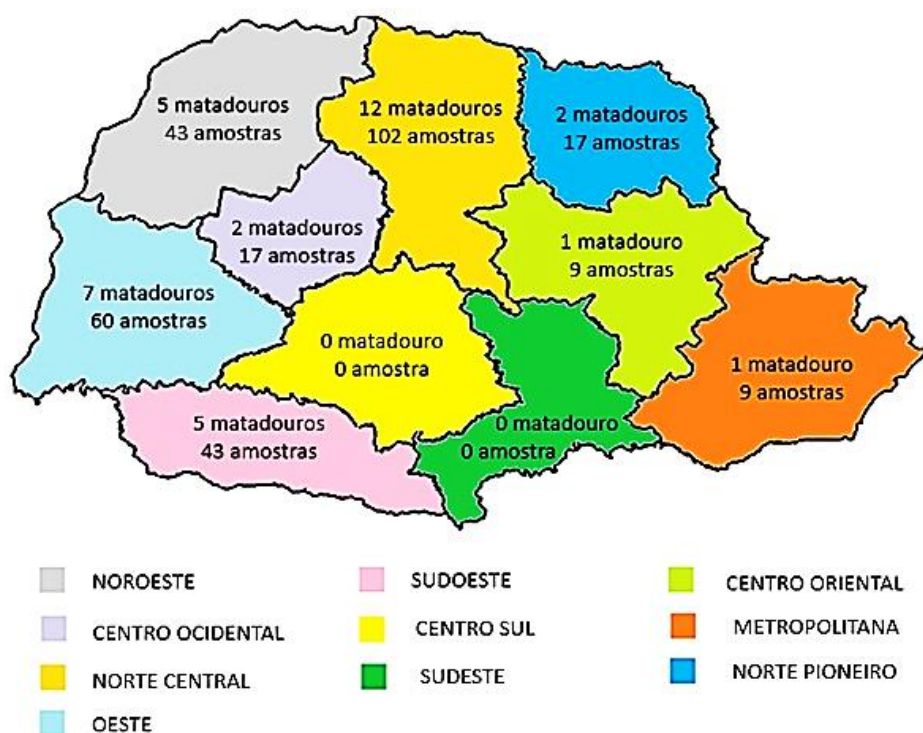
Dessa forma, chegou-se a amostragem mínima de 289 cortes. A fim de facilitar a distribuição das amostras e admitindo que alguma falha pudesse ocorrer, esse número foi aumentado para 300. Objetivando avaliar a ocorrência de *Salmonella* sp. em todo estado do Paraná, a coleta de amostras foi distribuída em todas as regiões produtoras do estado. A divisão do estado em regiões seguiu a determinação da Lei Estadual nº 15.825 (PARANÁ, 2008).

A coleta de amostras foi baseada na quantidade de matadouros de aves por região, de acordo com dados do Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná (SINDIAVIPAR, 2014). Das 10 regiões do estado, somente em 8 operam matadouros de aves. A distribuição dos matadouros por região e a quantidade de amostras coletadas em cada região está demonstrada na FIGURA 1.

No total, foram adquiridas e analisadas 300 amostras de cortes de frango, sendo 71 amostras de asa (coxinha, meio e asa inteira), 72 de perna (coxa,

sobrecoxa e perna inteira), 103 de peito (filé de peito, filezinho e peito inteiro) e 54 amostras de frango a passarinho. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados dentro do estado do Paraná e transportadas em caixas isotérmicas com gelo até o Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA), da Universidade Federal do Paraná (UFPR), para a realização das análises propostas.

FIGURA 1 - QUANTIDADE DE MATADOUROS DE AVES E AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO ANALISADAS POR REGIÃO DO ESTADO DO PARANÁ.



FONTE: A autora (2017)

4.2 AVALIAÇÃO DE ROTULAGEM E EMBALAGEM

A primeira avaliação realizada nas amostras foi um *check list* para verificar a conformidade das embalagens com relação às legislações vigentes (Apêndice 1). Os parâmetros avaliados estão demonstrados no QUADRO 1. Cada item avaliado foi julgado em Conforme (C) ou Não Conforme (NC) de acordo com o atendimento ou não à legislação específica. Foram seguidos os padrões determinados pelo Código de Defesa do Consumidor (BRASIL, 1990), pela RDC nº 13 (BRASIL, 2001b), pela Instrução Normativa nº 22 (BRASIL, 2005) e pela RDC nº 360 (BRASIL, 2003c).

QUADRO 1 - PARÂMETROS AVALIADOS NOS RÓTULOS E EMBALAGENS DE CORTES DE FRANGO CONGELADOS E SUAS RESPECTIVAS BASES LEGAIS.

PARÂMETRO AVALIADO	REFERÊNCIA
Data de fabricação e prazo de validade	Brasil (2005)
Lote	Brasil (2005)
Embalagem intacta	Brasil (1990)
Declaração do valor calórico, nutrientes e componentes	Brasil (2003c)
Presença de corpo estranho	Brasil (1990)
Identificação de Origem	
Nome ou razão social	Brasil (2005)
Endereço do estabelecimento	Brasil (2005)
Carimbo oficial da Inspeção Federal	Brasil (2005)
Categoria do estabelecimento segundo classificação oficial	Brasil (2005)
CNPJ do fabricante	Brasil (2005)
Registrado no MAPA/SIF/DIPOA nº...	Brasil (2005)
Contato do Serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC)	*
Peso	
Indicação de peso	Brasil (2005)
Peso igual ao indicado na embalagem	Brasil (2005)
Rotulagem	
Marca comercial do produto	Brasil (2005)
Denominação de venda do produto de origem animal	Brasil (2005)
Composição do produto	Brasil (2005)
Conservação/Preparo	
Instrução sobre uso/preparo do produto	Brasil (2005)
Forma de conservação do produto	Brasil (2005)
Presença dos dizeres sobre manuseio e segurança	Brasil (2001b)

*Ausência de dispositivo legal que obrigue sua presença nos rótulos de produtos avícolas.

FONTE: A autora (2017)

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.3.1 Coliformes termotolerantes

Em 154 das 300 amostras foi realizada a contagem de coliformes termotolerantes (CT), por meio da técnica de Número Mais Provável – NMP (BRASIL, 2003d).

Uma alíquota de 25 gramas de cada amostra foi pesada, seguido da adição de 225ml de Solução Salina 0,85% e homogeneização. A partir dessa diluição foram realizadas mais duas diluições seriadas, obtendo-se as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , equivalentes aos inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 grama, respectivamente. Para a inoculação foram utilizadas três séries de três tubos cada, contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST) (BD Difco™) e tubos de Durhan invertidos. Na primeira série foi adicionado 1ml da diluição 10^{-1} em cada tubo, na segunda série 1ml da diluição 10^{-2} em cada tubo e na terceira série, 1ml da diluição 10^{-3} em cada tubo.

Após a inoculação, todos os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas e a presença de coliformes foi evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durhan, produzido pela fermentação da lactose contida no meio.

Nos tubos de Durhan onde o gás ocupou no mínimo 1/10 do volume do tubo foi realizada a confirmação da presença de coliformes termotolerantes. Para isso, uma alçada do caldo LST foi transferida para tubos contendo caldo EC (BD Difco™) e tubos de Durhan invertidos. Esses tubos foram incubados em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas, em banho-maria, e a presença de gás nos tubos de Durhan confirmou a existência de coliformes termotolerantes na amostra analisada.

A combinação de tubos com resultado positivo em cada série foi comparada com Tabelas de Número Mais Provável, e os resultados foram expressos em NMP/g de alimento analisado.

4.3.2 *Salmonella* spp.

4.3.2.1 Quantificação por mNMP

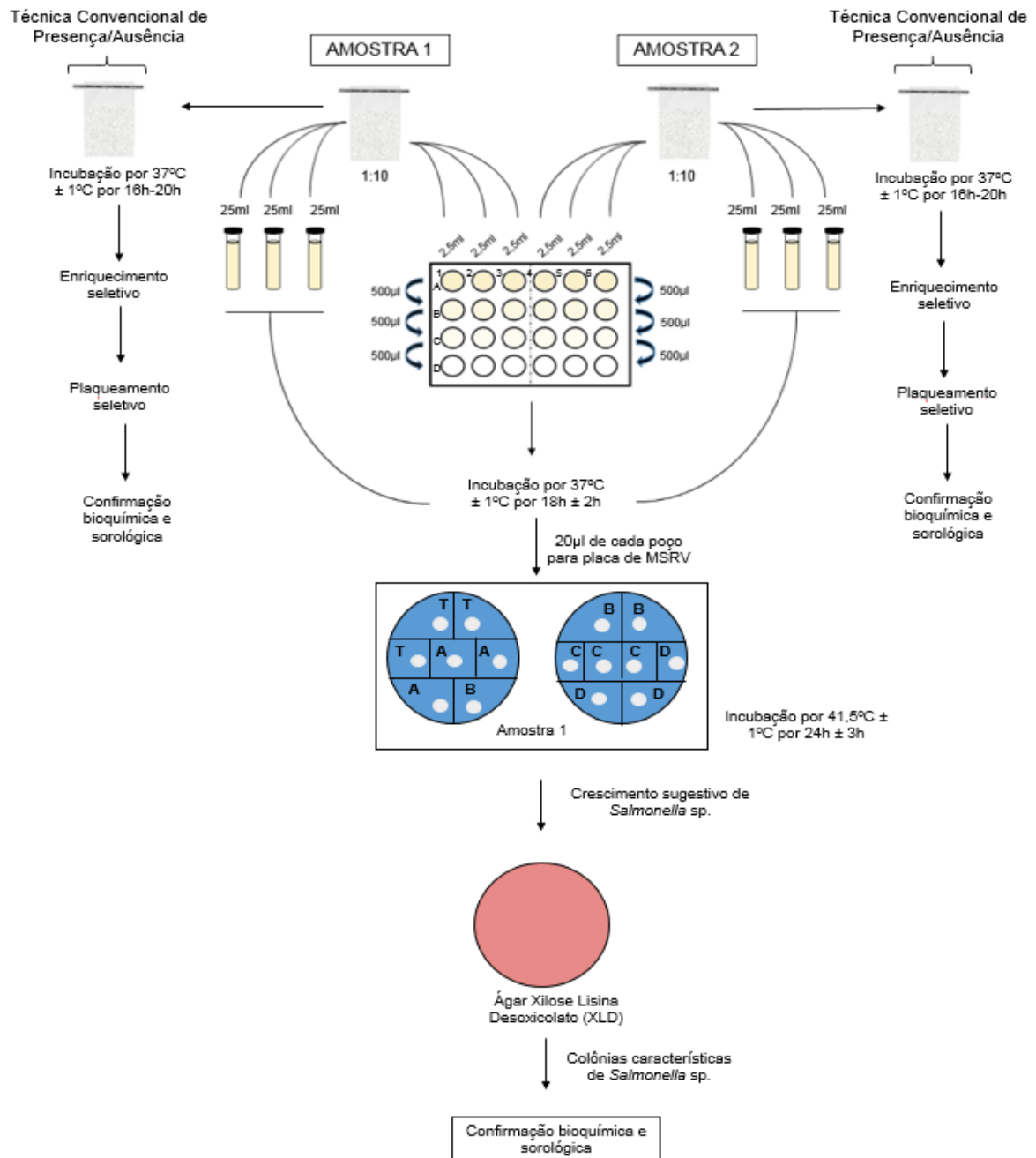
A quantificação de *Salmonella* sp. presente em cada amostra foi realizada por meio do método de Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) (ISO/TS, 2012) conforme ilustrado na FIGURA 2.

Uma alíquota de 25 gramas de cada amostra foi pesada, seguido da adição de 225ml de Água Peptonada Tamponada (APT) (BD Difco™). Após homogeneização, 7,5ml foram divididos em três poços, numa placa de cultura de células de 24 poços. Em seguida, 500µl de cada um dos primeiros poços foram transferidos para poços subsequentes, os quais continham 2ml de APT. O procedimento foi repetido em mais três sequências de semeadura até a obtenção de quatro diluições. Cada placa de 24 poços foi dividida em duas, sendo possível a realização simultânea do mNMP de duas amostras diferentes. O restante da amostra foi incubada para verificação da presença/ausência de *Salmonella* sp.

Devido à baixa sensibilidade da técnica de mNMP, observada nas primeiras 52 amostras, realizou-se uma modificação na parte inicial da técnica. Seguindo a relação 1:10, pesou-se 32,5g de amostra e adicionou-se 292,5ml de APT. Após homogeneização, três alíquota de 25 ml foram transferidas para uma série de três tubos. Esses tubos adicionais foram incubados e passaram pelos mesmos

procedimentos da placa de 24 poços, procedendo-se normalmente a técnica de contagem e de presença/ausência (FIGURA 2).

FIGURA 2 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCEDIMENTO AO QUAL AS AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO FORAM SUBMETIDAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* SP



As placas de 24 poços, juntamente com os tubos, foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por $18 \pm 2\text{h}$. Após incubação, 20µl de cada tubo e de cada poço foram

transferidos para placas contendo MSRV (Rappaport-Vassiliadis Semissólido) (BD Difco™) e essas foram incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$. Cada poço que apresentou mudança de cor de azul para branco, em 24 horas, considerado positivo para *Salmonella* sp., foi estriado em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (BD Difco™). Placas com poços negativos com 24 horas foram novamente incubadas por mais 24 horas, totalizando 48 horas de incubação. A mudança de cor que ocorre no meio MSRV é decorrente da migração de cepas de *Salmonella* sp. móveis, as quais são selecionadas devido à presença de oxalato de verde malaquita, cloreto de magnésio, novobiocina e pH reduzido do meio, entre 5,2 e 5,4.

A transferência das colônias suspeitas do ágar semissólido MSRV para o ágar XLD foi realizada com auxílio de alça de platina. Após inoculação, as placas de XLD foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$. Placas com crescimento característico de *Salmonella* sp. foram selecionada e três colônias suspeitas de cada uma foram submetidas a confirmação bioquímica e aglutinação em placa com antissoro polivalente.

Para confirmação bioquímica, inicialmente as colônias foram inoculadas nos ágares Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (BD Difco™) e Lisina Ferro (LIA) (BD Difco™), ambos incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$. Colônias com reações características para o gênero *Salmonella* sp. nesses testes, foram inoculadas nos caldos Ureia (BD Difco™), Vermelho de Metila (VM) (BD Difco™) e Voges-Proskauer (VP) (BD Difco™) e no ágar Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) (BD Difco™). Todos esses tubos foram incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$. A metodologia ISO 6579-2 (ISO/TS, 2012) determina somente a utilização dos ágares LIA e TSI e do caldo ureia para confirmação de *Salmonella* sp., entretanto, optou-se por realizar também a inoculação nos caldos VM, VP e no ágar SIM. Colônias com características bioquímicas compatíveis com o gênero *Salmonella* sp. foram purificadas em placas contendo ágar Verde Brilhante (BG) (BD Difco™) e em seguida submetidas ao teste de aglutinação em placa com antissoro polivalente OMA (Bio-Rad Laboratories, Inc., França).

Se qualquer umas das três colônias testadas fosse compatível com *Salmonella* sp., o poço ou o tubo de onde essa colônia foi retirada era considerado positivo. Dessa forma, obteve-se a combinação de poços positivos em cada uma das quatro diluições e também a confirmação da presença de *Salmonella* sp. nos tubos, incluídos pela modificação da técnica.

Os valores encontrados foram convertidos em número de *Salmonella*/grama de amostra, com auxílio do MPN Calculation Program (2013), versão 3.

Após a confirmação sorológica, duas colônias de cada amostra, em duplicata, foram transferidas para tubos do tipo eppendorf, previamente identificados, contendo 1ml de caldo Triptona de Soja (TSB) (BD Difco™). Esses tubos foram incubados por $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$, adicionados de 150-200µl de glicerol, previamente autoclavado, homogeneizados e então armazenados em freezer a temperatura de -20°C até o momento do uso.

4.3.2.2 Verificação da Presença/Ausência

A verificação da presença/ausência de *Salmonella* sp. nas amostras foi realizada por meio da metodologia ISO 6579:2007 (ISO, 2007).

O restante da amostra, a qual não foi utilizada na técnica de quantificação, foi incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por $18 \pm 2\text{h}$. Desse pré-enriquecimento, 0,1ml foi transferido para um tubo contendo caldo Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) (BD Difco™) e 1ml foi transferido para um tubo com caldo Tetrationato Muller-Kauffmann (MKTT) (BD Difco™). O caldo RVS foi incubado a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ e o caldo MKTT foi incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, ambos por $24 \pm 3\text{h}$. Após incubação, esses caldos seletivos foram estriados em placas de ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (BD Difco™) e Bismuto Sulfito (BS) (BD Difco™), e essas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$. Foram então selecionadas três colônias características de cada placa para confirmação bioquímica e prova de aglutinação em placa com antissoro polivalente.

Para confirmação bioquímica, inicialmente as colônias foram inoculadas nos ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (BD Difco™) e Lisina Ferro (LIA) (BD Difco™), ambos incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Colônias sugestivas do gênero *Salmonella* sp. foram submetidas às provas de Vermelho de Metila (VM) (BD Difco™), Voges-Proskauer (VP) (BD Difco™), Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) (BD Difco™) e produção de urease (caldo ureia) (BD Difco™).

Colônias com características bioquímicas compatíveis com o gênero *Salmonella* sp. foram purificadas em ágar Verde Brilhante (BG) (BD Difco™) e depois submetidas ao teste de aglutinação em placa com antissoro polivalente OMA (Bio-Rad Laboratories, Inc., França).

As colônias características de *Salmonella* sp. foram então selecionadas e guardadas. Para a seleção das colônias foi utilizado como critério o caldo e o ágar de onde elas foram obtidas, gerando as combinações RVS/XLD, RVS/BS, MKTT/XLD e MKTT/BS. Dessa forma, quando colônias de *Salmonella* sp. foram confirmadas em todas as combinações, quatro colônias da amostra foram guardadas, em duplicata, sendo cada uma proveniente de uma das combinações. Quando não houve confirmação de *Salmonella* sp. em todas as combinações, as combinações negativas foram excluídas e, das combinações confirmadas, guardou-se duas colônias, em duplicata, de cada uma.

Para guardar as colônias, estas foram transferidas das placas de BG para tubos do tipo eppendorf, previamente identificados, contendo 1ml de caldo Triptona de Soja (TSB) (BD Difco™). Esses tubos foram incubados por $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$, adicionados de 150-200µl de glicerol, previamente autoclavado, homogeneizados e então armazenados em *freezer* a temperatura de -20°C até o momento do uso.

4.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Foram submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos todos os 179 isolados de *Salmonella* sp. obtidos nas etapas de detecção e quantificação.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado de acordo com as normas M31-A3 (CLSI, 2008) e M100-S23 (CLSI, 2013) do Clinical Laboratory Standards Institute para disco-difusão em ágar. Como controle do teste foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922.

Cada um dos 179 isolados foi testado frente a 6 classes de antimicrobianos: (1) Beta-lactâmicos: Ampicilina – AMP (10µg), Cefepime – CPM (30 µg), Ceftriaxone – CRO (30 µg), Meropenem – MER (10 µg), Imipenem – IPM (10 µg), Aztreonam – ATM (30 µg) e Amoxicilina com Ácido Clavulânico – AMC (20/10 µg); (2) Aminoglicosídeos: Gentamicina – GEN (10 µg), Amicacina – AMI (30 µg) e Tobramicina –TOB (10 µg); (3) Tetraciclinas: Tetraciclina – TET (30 µg) e Doxíciclina – DOX (30 µg); (4) Quinolonas: Ácido Nalidíxico – NAL (30 µg) e Ciprofloxacina – CIP (5 µg); (5) Inibidores do Folato: Sulfametoxazol com Trimetoprim – SUT (23,75/1,25 µg); (6) Cloranfenicol: CLO (30 µg) (Cecon®).

Devido à presença de mais de um isolado originário da mesma amostra, foi realizada uma triagem ao final do teste de sensibilidade aos antimicrobianos,

objetivando reduzir o número de isolados submetidos às análises posteriores. Para isso, foi avaliado o padrão fenotípico de resistência apresentado no teste de sensibilidade. Isolados provenientes da mesma amostra e que apresentaram o mesmo padrão de resistência, foram consideradas iguais, sendo somente um deles selecionado para os testes posteriores. Isolados provenientes da mesma amostra e que apresentaram padrões distintos, foram mantidos. Dessa forma, foram selecionados 98 isolados, sendo estes submetidos às análises descritas abaixo.

4.4.1 Triagem para produção de enzimas ESBL

Após o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, os isolados que apresentaram resistência ou resistência intermediária a um ou ambos agentes Beta-lactâmicos, Ceftriaxone ou Cefepime, foram testados para produção de enzimas ESBL, por meio do método de disco-difusão dupla (EUCAST, 2013). Para isso, foi aplicado um disco central contendo a combinação de Amoxicilina com Ácido Clavulânico - AMC (20/10 µg) (Cecon®). Em um raio de 20mm a partir do disco central foram aplicados três discos, dois de cefalosporinas de terceira geração (Ceftazidime – CAZ – 30 µg e Cefotaxime – CTX – 30 µg) e uma cefalosporina de quarta geração (Cefepime – CPM – 30 µg). O controle do teste foi realizado com uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922.

Foram considerados positivos para produção de enzimas ESBL os isolados de *Salmonella* sp. que apresentaram zonas de inibição em torno de qualquer cefalosporina aumentadas na direção do disco com Ácido Clavulânico (EUCAST, 2013). Esses isolados foram avaliadas por meio de PCR para confirmação de genes que codificam enzimas ESBL e esses genes foram sequenciados.

4.5 ANÁLISES MOLECULARES

4.5.1 Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano das 98 cepas de *Salmonella* sp. foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), partindo-se de culturas ressuspensas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), após 24 horas de incubação a

35-37°C. Todas as 98 cepas foram submetidas às análises moleculares descritas abaixo.

4.5.2 Confirmação de gênero

Para confirmação do gênero *Salmonella* foi pesquisada a presença do gene *invA*, conforme protocolo descrito por Swamy et al. (1996).

Para preparar a reação de PCR foi utilizado 12,5 µl de GoTaq Green MasterMix (Promega), 10 µM de cada *primer* e 10,5 µl de água ultrapura Nuclease-free (Promega) para completar o volume final de 24 µl. Por último foi adicionado 1 µl do DNA extraído. A amplificação foi realizada empregando-se um ciclo inicial de 93°C durante 1 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 42°C por 1 minutos e 72°C por 20 segundos, com um ciclo de extensão final de 72°C por 2 minutos. Foi utilizado um controle negativo e uma cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14.028 como controle positivo.

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando 80V e 120mA por 90 minutos, corados com GelRed™ e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

Os *primers* utilizados para confirmação do gênero *Salmonella* estão demonstrados no QUADRO 2.

QUADRO 2 - SEQUÊNCIA DE *PRIMERS* UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO *SALMONELLA* SP.

ALVO	SEQUÊNCIA DO <i>PRIMER</i> (5' – 3')	TAMANHO (PB)	GENE ALVO	REFERÊNCIA
<i>Salmonella</i> sp.	TTGTTACGGCTATTTTGACCA CTGACTGCTACCTTGCTGATG	521	<i>invA</i>	Swamy et al. (1996)

FONTE: A autora (2017)

4.5.3 Pesquisa de genes que conferem resistência aos antimicrobianos Cloranfenicol, Tetraciclina, Trimetoprim e Sulfametoxazol

Nos 98 isolados foi avaliada a presença dos genes *catA*, *tetA*, *tetB*, *Z0055*, *sul1* e *sul2*, segundo protocolos de referência (QUADRO 3). A expressão desses genes confere resistência ao Cloranfenicol (*catA*), a Tetraciclina (*tetA* e *tetB*), ao Trimetoprim (*Z0055*) e ao Sulfametoxazol (*sul1* e *sul2*).

O preparo das reações e a visualização dos produtos da PCR ocorreram da mesma forma como descrito anteriormente, com variações nos programas de amplificação do material genético de acordo com o protocolo descrito para cada *primer*.

QUADRO 3 - SEQUÊNCIAS DE *PRIMERS* UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA AVALIAR A PRESENÇA DOS GENES *CATAI*, *TETA*, *TETB1*, *Z0055*, *SUL1* E *SUL2* NOS ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP.

GENE ALVO	SEQUÊNCIA DO <i>PRIMER</i> (5' – 3')	TAMANHO (PB)	ANTIMICROBIANO AO QUAL CONFERE RESISTÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>catA1</i>	CGCCTGATGAATGCTCATCCG CCTGCCACTCATCGCAGTAC	457	Cloranfenicol	Aarestrup et al. (2003)
<i>tetA</i>	GTAATTCTGAGCACTGTGCG CTGCCTGGACAACATTGCT	957	Tetraciclina	Waters et al. (1983)
<i>tetB1</i>	GTTCGACAAAGATCGCATTG TGCCCTCTTGGGTTATCAAG	562	Tetraciclina	Young (2011)
<i>Z0055</i>	GGTCGCGTTTATGAGCAGTT GTGAGAGTTCTGCGCATCAG	159	Trimetoprim	<i>Primers</i> cedidos pelo InsPOA (UFV)
<i>sul1</i>	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC GCAAGGCGGAAACCCGC GCC	450	Sulfametoxazol	Sundström et al. (1988)
<i>sul2</i>	TTTCGGCATCGTCAACATAA GTGTGTGCGGATGAAGTCAG	727	Sulfametoxazol	<i>Primers</i> cedidos pelo InsPOA (UFV)

FONTE: A autora (2017)

4.5.4 Confirmação molecular da presença de genes que codificam enzimas ESBL

Dentre os 98 isolados de *Salmonella* sp., aqueles positivos para produção de enzimas ESBL na triagem fenotípica foram submetidos à pesquisa dos genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*, *bla_{SHV}*, *ampC* e *bla_{TEM}*, segundo protocolos já descritos (BELAAOUAJ et al., 1994; M'ZALI et al., 1996; FERIA, 2002; EDELSTEIN et al., 2003). As sequências dos primers estão descritas no QUADRO 4.

O preparo das reações e a visualização dos produtos da PCR ocorreram da mesma forma como descrito anteriormente, com variações nos programas de amplificação do material genético de acordo com o protocolo descrito para cada *primer*.

QUADRO 4 - SEQUÊNCIAS DE *PRIMERS* UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA AVALIAR A PRESENÇA DE GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS ESBL EM ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP.

GENE ALVO	SEQUÊNCIA DO <i>PRIMER</i> (5' – 3')	TAMANHO (PB)	REFERÊNCIA
<i>bla_{CTX-M}</i>	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	543	Edelstein et al. (2003)
<i>bla_{OXA}</i>	ATCTACAGCAGCGCCAGTTG CGCATCAAATGCCATAAGTG	199	Feria (2002)
<i>bla_{SHV}</i>	TCAGCGAAAAACACCTTG TCCCGCAGATAAATCACCA	471	M'zali et al. (1996)
<i>bla_{TEM}</i>	TACGATACGGGAGGGCTTAC TTCCTGTTTTTGCTCACCCA	716	Belaouaj et al. (1994)
<i>amp_C</i>	CCCGCTTATAGAGCAACAA TCAATGGTCGACTTCACACC	634	Feria (2002)

FONTE: A autora (2017)

4.5.5 Sequenciamento dos *amplicons bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*

Os *primers* e o ciclo de PCR utilizados para obtenção dos produtos a serem amplificados foram os mesmos usados na técnica convencional de PCR, já descrita para os genes *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*. Após a amplificação, os *amplicons* foram purificados com o kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen Inc., Valencia, CA) e enviados ao Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP) para sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com sequências existentes no GenBank, utilizando o BLAST, com auxílio do programa Mega 7.

4.5.6 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A eletroforese em Gel de Campo Pulsado foi realizada nos 98 isolados, segundo protocolo descrito por Ribot et al. (2006).

Os isolados de *Salmonella* sp. foram inoculados em caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período, ajustou-se a densidade óptica de cada caldo para aproximadamente 1 ($\lambda=610\text{nm}$) e uma alíquota de 400µl da suspensão ajustada foi transferida para microtubo e centrifugada a 16.000 RPM por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular tratado com proteinase K para depois ser misturado com *seake gold agarose* 1% (baixo ponto de fusão) e formar os *plugs*. Os *plugs* foram então adicionados à solução de *cell lysis buffer* e depois lavados com água mili Q e *TE buffer*.

Para a digestão enzimática, cerca de 1/3 do *plug* original foi seccionado e depositado em microtubos de 1,5 ml contendo 200 µl de buffer e 50 U da enzima *XbaI* (NewEngland Biolabs, Inc.), seguido de incubação a 37°C por 2 horas.

O DNA digerido foi separado em equipamento CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) utilizando o protocolo de um bloco com *inital switch time* de 2,2s, *final switch time* de 63,8s, voltagem de 6 V/cm, ângulo de 120° e tempo de corrida de 16 horas. O tampão de corrida utilizado foi o TBE 0,5X e a temperatura durante a corrida do gel foi mantida em 14°C. Como marcador de peso molecular foi utilizada a cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Braenderup (ATCC® BAA- 664™).

Os géis foram corados com intercalante UniSafe Dye Nucleic Acid Staining Solution (Uniscience Corporation, Miami, USA) em banho de imersão de 30 minutos. Em seguida, cada gel foi submetido a três lavagens com água destilada, de 20 minutos cada, e então visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta.

Os padrões de restrição obtidos por PFGE foram analisados usando o *software* BioNumerics versão 7.6 (Applied-Maths, Kortrijk, Belgium). Para gerar o dendograma, o padrão de bandas foi comparado usando o coeficiente de similaridade de Dice, com tolerância de 1,5%, e análise de clusters UPGMA (Unweighed Pair Group Method Using Arithmetic Average).

Para interpretação dos resultados, perfis com similaridade ≥80% foram considerados semelhantes e aqueles com similaridade de 100% foram considerados perfis clonais.

4.6 SOROTIPAGEM

A caracterização dos 98 isolados de *Salmonella* sp. com base nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) foi realizada pelo Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Várias Proporções foi utilizado para analisar a diferença entre os percentuais de positividade de *Salmonella* sp. nos diferentes cortes de frango.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A análise foi realizada com auxílio do programa BioEstat 5.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EMBALAGEM E ROTULAGEM

Das 300 embalagens analisadas, 31,7% (95/300) apresentaram alguma não conformidade relacionada à embalagem ou rotulagem. Algumas amostras apresentaram mais de um item avaliado em desacordo, totalizando 140 não conformidade encontradas (FIGURA 3). No trabalho desenvolvido por Monteiro et al. (2007) na Cidade de Porto, em Portugal, 62% das embalagens de produtos avícolas avaliadas possuíam algum item em desacordo com a legislação local.

A maior ocorrência foi a presença de furos, rasgos ou abertura da selagem, observada em 46 amostras (15,3%). Percentual superior a esse foi descrito por Bastos et al. (2008), na Bahia, ao encontrarem 35,3% das embalagens de frango congelados perfuradas. Embalagens furadas ou rasgadas podem determinar a perda da qualidade do produto, possibilitando a ocorrência de contaminação pós processamento e elevando o risco de veiculação de micro-organismos patogênicos por meio dos alimentos. Essa é uma ocorrência que pode estar relacionada com a manipulação incorreta tanto na indústria quanto no comércio.

Em ordem decrescente, foram encontradas irregularidades relacionadas à falta de informação nutricional (9%), ausência de contato telefônico para o SAC (7,3%), ausência de lote de produção ou número ilegível (6%), peso inferior ao indicado na embalagem (3,3%), ausência de classificação oficial do estabelecimento produtor (2%), presença de corpo estranho junto a carne (1%) e não declaração da composição do produto (0,3%). No grupo “outras não conformidades” foi observado seis produtos congelados com prazo de validade de somente 15 dias e um produto com data de fabricação posterior à data de vencimento (FIGURA 4), correspondendo a 2,3% dos produtos analisados. O prazo de validade é determinado pela indústria, podendo sofrer variações de um estabelecimento para outro. Entretanto, essas seis amostras foram consideradas NC porque diferiram no prazo de validade de 1 ano (para produtos mantidos a -12°C ou mais frio) determinado na embalagem de outras amostras analisadas (cortes idênticos), produzidas pela mesma indústria.

A RDC nº 360 (BRASIL, 2003c) determina que as carnes *in natura* refrigeradas ou não, pré-embaladas na ausência do cliente e prontas para serem oferecidas diretamente ao consumidor devem apresentar rotulagem nutricional.

Nesse trabalho, a falta de tabelas ou dizeres contendo a informação nutricional do produto foi observada em 27 amostras (9%).

FIGURA 3 - QUANTIDADE DE NÃO CONFORMIDADES ENCONTRADAS EM RÓTULOS E EMBALAGENS DE CORTES DE FRANGO CONGELADOS PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ.



FONTE: A autora (2017)

FIGURA 4 - EMBALAGEM DE CORTES DE FRANGO (SOBRECORA) COM A DATA DE FABRICAÇÃO POSTERIOR À DATA DE VALIDADE.



FONTE: A autora (2017)

A presença de contato telefônico para o SAC em embalagens de carne de aves não é regulamentada por nenhuma lei específica, porém foi avaliada por ser considerada essencial para a comunicação entre o consumidor e a indústria. Por meio do SAC os fabricantes podem receber o retorno dos consumidores a respeito

de possíveis defeitos decorrentes do processo produtivo dos alimentos. Essas informações são úteis para auxiliar a indústria em modificações ou adaptações para melhoria nas linhas de produção. O número elevado de não conformidades para esse item demonstra desinteresse por parte da indústria na troca de informações com seus clientes, impossibilitando conhecer a opinião, ouvir reclamações ou sugestões de quem consome seus produtos.

Em 18 amostras avaliadas não foi observada a indicação do lote, evidenciando-se descontrole de produção. Isso inviabiliza a rastreabilidade do alimento e impede a adoção de medidas corretivas em caso de necessidade de *recall*, por exemplo.

Quanto ao atendimento à RDC nº 13 (BRASIL, 2001b) nenhuma amostra apresentou irregularidade. Resultado diferente foi observado por Ristori et al. (2008) em São Paulo, os quais encontraram 60% dos rótulos de carcaças de frango avaliados em desacordo com essa legislação. Essa diferença observada entre os dois trabalhos provavelmente é reflexo do tempo decorrido desde a implantação da RDC nº 13 até a análise das amostras. As amostras avaliadas por Ristori et al. (2008) foram obtidas entre os anos 2004 e 2006, pouco tempo depois da vigência da RDC nº 13. As amostras avaliadas pelo presente trabalho foram coletadas e analisadas cerca de 15 anos após a implantação dessa Resolução. A ausência de NC mostra que as indústrias realmente estão dando atenção a essa importante exigência de informar o consumidor sobre a forma correta de preparo da carne de aves antes do consumo.

Além do potencial perigo biológico decorrente de falhas na integridade das embalagens, a observação de materiais que podem acarretar perigos físicos ao consumidor também foi constatada neste trabalho. Foram encontradas três amostras contendo corpos estranhos de diferentes origens junto ao produto cárneo. Uma delas possuía um pedaço de metal, outra um pedaço de plástico e a terceira, um material com “aspecto de cinzas” (FIGURA 5).

A presença desses materiais dentro das embalagens caracteriza falhas no processo produtivo, possivelmente por deficiência na implantação ou verificação do programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). O objetivo do APPCC é identificar os pontos onde pode ocorrer a contaminação do alimento na linha de produção e adotar medidas preventivas, a fim de garantir a segurança do alimento durante toda a etapa produtiva, e não somente no produto final. Se a

identificação dos perigos não for criteriosamente realizada ou se as etapas de monitoramento e verificação dos pontos críticos de controle não for realizada com a precisão necessária, perigos físicos, como os descritos neste trabalho, químicos e biológicos podem ocasionar sérios danos à saúde do consumidor.

FIGURA 5 - AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO CONTENDO CORPOS ESTRANHOS.



Da esquerda para direita: Plástico; Metal; Material com "Aspecto de cinzas".
FONTE: A autora (2017)

Negligências por parte da indústria, além de violarem o Código de Defesa do Consumidor, também infringem o Código Civil. O artigo 12, parágrafo 1º, inciso II, do Código de Defesa do Consumidor dispõe que um produto é defeituoso quando não oferece a segurança que dele legitimamente se espera, levando-se em consideração o uso e os riscos razoavelmente esperados. Já segundo o Código Civil, em seu artigo 186, aquele que, por ação ou omissão voluntária, negligência ou imprudência, violar direito e causar dano a outrem, ainda que exclusivamente moral, comete ato ilícito (BRASIL, 2002). Dessa forma, quando o consumidor sofre danos pelo consumo de algum alimento contendo substância estranha à sua composição, cabe à indústria produtora ressarcir moralmente a pessoa lesada.

A possibilidade de ocorrência de falhas como essas na cadeia produtiva da carne de aves enfatiza a necessidade da presença de contato para o SAC nas embalagens, assim como da presença de identificação de lote. Essas informações possibilitam que o consumidor informe à indústria sobre a ocorrência de irregularidades nos produtos e que a empresa execute os procedimentos de recolhimento (*recall*), quando necessário.

5.2 COLIFORMES TERMOTOLERANTES

As 154 amostras submetidas a contagem de coliformes termotolerantes apresentaram valores inferiores a 10^4 NMP/g, estando de acordo com os padrões estabelecidos pela RDC nº 12 (BRASIL, 2001a). Vários trabalhos que objetivaram avaliar este mesmo padrão de conformidade, também encontraram resultados satisfatórios (CARDOSO et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; DELÚ et al., 2006; FERNANDES et al., 2016).

Entretanto, o atendimento à legislação não pode ser interpretado como ausência de contaminação. Sendo a contagem de coliformes termotolerantes o único padrão legal a ser avaliado, todas as amostras seriam consideradas aptas ao consumo. Contudo, 40 delas (26%) estavam contaminadas por *Salmonella* sp. representando um risco ao consumidor.

Dessa forma, pode-se afirmar que a detecção de *Salmonella* sp. em carne de aves é fundamental para garantir a segurança microbiológica e para determinar os riscos efetivos que os produtos avícolas podem representar para os consumidores, não devendo sua presença ser presumida somente pela ocorrência de altas contagens de coliformes termotolerantes, já que essa associação nem sempre é verdadeira (LINDBLAD et al., 2006; FERNANDES et al., 2016).

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* SP.

O teste de Número Mais Provável de *Salmonella* sp. por grama de produto apresentou resultados quantificáveis somente em 23 das 300 amostras analisadas, o que corresponde a 7,66%. Em cinco dessas amostras, *Salmonella* sp. não foi detectada na técnica de presença/ausência, já nas demais 18, o patógeno foi identificado por ambas as técnicas (TABELA 3). Todos os isolados foram confirmados para o gênero *Salmonella* spp. por meio do gene *invA*.

Discrepâncias como essa já foram descritas em outros trabalhos utilizando as duas técnicas. Mion et al. (2016), ao analisar 1.071 amostras de campo e da indústria, obtiveram resultados coincidentes por ambas as técnicas somente em uma das 9 amostras positivas para *Salmonella* sp. Cinco amostras foram positivas para o patógeno somente na microbiologia convencional e três somente na técnica de mNMP. Santos et al. (2015) analisaram 108 amostras em diferentes pontos de três matadouros, e encontraram *Salmonella* sp. em seis amostras. Todas as amostras

foram positivas na técnica microbiológica convencional, porém, somente duas foram positivas nos dois métodos.

TABELA 3 - NÚMERO DE AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO ONDE FOI ENCONTRADO *SALMONELLA* SP. DE ACORDO COM A METODOLOGIA UTILIZADA.

		QUANTIFICAÇÃO (MNMP)		
		+	-	
PRESENÇA/AUSÊNCIA	+	18	72	90
	-	5	205	210
		23	277	300

FONTE: A autora (2017)

Resultados positivos somente na técnica de mNMP podem ser atribuídos à heterogeneidade na distribuição de *Salmonella* e outras bactérias em amostras naturalmente contaminadas, fazendo com todas as células do patógeno sejam transferidas para a placa de cultura de células, onde é realizada a técnica de contagem, e não possam ser detectadas pela técnica de presença/ausência.

Amostras positivas na análise qualitativa, mas negativas na quantificação por mNMP provavelmente possuem número de células de *Salmonella* inferior ao limite de detecção do teste (1 NMP/g), que é menor que o limite de detecção da microbiologia convencional (0,04 UFC/g) (ISO/TS, 2012).

Após a modificação na parte inicial da técnica de mNMP, pela adição dos três tubos, houve um aumento no número de amostras com *Salmonella* sp. quantificável. Antes da adição dos tubos, apenas 11% das amostras que apresentavam *Salmonella* sp. na técnica convencional, também apresentavam valores quantificáveis. Após a adição dos tubos, esse valor passou para 29%. Provavelmente isso foi reflexo do maior volume de amostra utilizado nos tubos, 25ml em cada, quando comparado com o volume utilizado nos poços, 2,5ml em cada.

Os valores das contagens de *Salmonella* sp. variaram de 0,12 a 6,4 NMP/g de produto analisado, com a maioria das amostras apresentando valores menores que 3 NMP/g (TABELA 4).

Resultado semelhante foi reportado pelo Programa Microbiológico Americano de coleta de dados referentes a cortes de frango (RCPBS), o qual

encontrou 48% das amostras no intervalo 0,030 - 0,30, 15,5% entre 0,301 - 3,00 e 6% entre 3,01 e 30,00 (USDA/FSIS, 2012).

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO QUE APRESENTARAM VALORES DE *SALMONELLA* SP. QUANTIFICÁVEIS PELA TÉCNICA DE MNMP.

NMP/G	NÚMERO DE AMOSTRAS	PERCENTUAL
0,030 – 0,30	12	52%
0,301 – 3,00	9	39%
3,01 – 30,00	2	9%
Total	23	100%

FONTE: A autora (2017)

Na análise conjunta dos dados do RCPBS com aqueles encontrados no presente trabalho, observa-se que a carne de aves geralmente apresenta baixa carga de *Salmonella* sp. No entanto, a salmonelose humana, decorrente do consumo de carne de aves, pode ser atribuída à replicação desse pequeno número de células no momento em que ocorrem abusos de temperatura durante o armazenamento, manipulação incorreta ou tratamento térmico insuficiente. A manipulação inadequada, além de propiciar a multiplicação das células de *Salmonella* sp. inicialmente presentes na carne de aves, pode também transferir essas células para outros alimentos, no momento em que são preparados conjuntamente. Essa contaminação cruzada se torna mais importante quando os alimentos envolvidos não serão submetidos a tratamento térmico antes do consumo, representando um grande risco no desenvolvimento de salmonelose.

5.4 PRESENÇA/AUSÊNCIA DE *SALMONELLA* SP.

Utilizando a metodologia ISO 6579:2007 (ISO, 2007), seguido de confirmação dos isolados pelo gene *invA* na PCR, a presença de *Salmonella* sp. foi detectada em 30% (90/300) das amostras analisadas. Entretanto, cinco amostras analisadas foram negativas na análise de presença/ausência mas apresentaram *Salmonella* sp. quantificável pela metodologia de mNMP. Dessa forma, considerou-se como percentual de ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de frango produzidos no estado do Paraná, 31,7% (95/300).

Esse resultado é bastante diverso daquele encontrado por Trainotti et al. (2013) que, ao analisarem 50 amostras de cortes de frango comercializados no

noroeste paranaense, não encontraram nenhuma amostra com *Salmonella* sp. Outros trabalhos realizados na região sul do Brasil, avaliando cortes de frango, também demonstraram frequências de ocorrência de *Salmonella* sp. diversas da encontrada neste trabalho, de 10,5% e 39,3% (BAU et al., 2001; RIBEIRO et al., 2007).

O percentual de ocorrência de *Salmonella* sp. de 31,7% em cortes também difere bastante daquele apresentado pelo PRP para carcaças, de 6,4% (BRASIL, 2010). O percentual baixo obtido pelo PRP é fruto de análises realizadas no período de 2003 a 2008, enquanto o presente trabalho avaliou cortes de frango sete anos mais tarde. Devido ao período de 13 anos, transcorrido desde a implantação do PNSA e do PRP, em 2003, até a análise dos cortes de frango pelo presente trabalho, percentuais menores eram esperados.

Essas diferentes prevalências podem ser influenciadas por variáveis geográficas e temporais, pelas condições higiênicas dos estabelecimentos de abate de onde essas amostras foram adquiridas, pela maior manipulação dos cortes quando comparados às carcaças e pela metodologia de coleta das amostras.

Para a produção de carcaças inteiras, as mesmas são embaladas logo após saírem do sistema de resfriamento de carcaças. Já para a produção de cortes, após saírem do sistema de resfriamento, as carcaças são conduzidas para as salas de corte, onde são divididas, manual ou automaticamente, nas porções desejadas. Nesse processo, principalmente pelo contato de um corte contendo *Salmonella* sp. com superfícies de equipamentos e também com as mãos dos manipuladores pode ocorrer a disseminação do patógeno para outros cortes (KUSUMANINGRUM et al., 2003; CHIA et al., 2009).

Além disso, deficiência nos processos de higienização dos equipamentos e utensílios pode propiciar a permanência de *Salmonella* sp. na indústria, na forma de biofilme, a qual tem papel importante na ocorrência de contaminação cruzada (ZIECH et al., 2016a). Considerando que tanto os cortes, avaliados neste trabalho, quanto as carcaças, avaliadas pelo PRP, foram provenientes de matadouros com SIF, e que nesses estabelecimentos rígidas medidas de controle de processo devem ser adotadas, não se pode afirmar que a maior manipulação dos cortes seja o único fator condicionante da elevada ocorrência de *Salmonella* sp. nesses produtos.

Um fator que pode ter exercido maior peso nessa desigualdade de percentuais está relacionado ao método de coleta das amostras. Os cortes

analisados neste trabalho foram obtidos em estabelecimentos varejistas, ou seja, retratam a real situação da carne de aves que está chegando ao consumidor. Já as carcaças, destinadas às análises para compor os dados do PRP, foram coletadas pela própria indústria processadora, o que pode gerar dados subestimados da real ocorrência de *Salmonella* sp. nesses produtos.

De forma geral, após a implementação das medidas de controle estabelecidas pelo PNSA e pelo PRP, ocorreu declínio dos principais sorotipos alvos desses programas (KOTTWITZ et al., 2013; VOSS-RECH et al., 2015; MION et al., 2016). Entretanto, novos sorotipos emergem e reemergem constantemente, fazendo com que prevalências elevadas ainda sejam encontradas em várias regiões, confrontando a magnitude de declínio de *Salmonella* sp. apresentada pelo PRP (RIBEIRO et al., 2007; RALL et al., 2009; YAMATOIGI et al., 2012; FERNANDES et al., 2016).

Os cortes que apresentaram maior percentual de amostras positivas para *Salmonella* sp. foram: asa (39,4%), frango a passarinho (31,5%) e peito (32%). Amostras de perna apresentaram o menor valor, com 23,6% de amostras positivas. Contudo, na análise de proporções, tanto por tipo de corte quanto por amostragem total, não foi observada diferença significativa entre os percentuais de positividade ($p > 0,05$) (TABELA 5).

TABELA 5 - AMOSTRAS DE CORTES DE FRANGO CONGELADOS POSITIVAS PARA *SALMONELLA* SP. CONSIDERANDO O PERCENTUAL POR TIPO DE CORTE E O PERCENTUAL POR TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS.

Corte	Presença de <i>Salmonella</i> sp./Amostras analisadas	Positividade por tipo de corte (%)	Positividade por amostragem total (n=300) (%)
Asa	28/71	39,4 ^a	9,3 ^a
Frango a passarinho	17/54	31,5 ^a	5,7 ^a
Peito	33/103	32 ^a	11 ^a
Perna	17/72	23,6 ^a	5,7 ^a
Total	95/300	-	31,7%

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística na comparação entre os percentuais de positividade pelo teste de Várias Proporções a 5% de probabilidade.

FONTE: A autora (2017)

Percentuais de positividade muito semelhantes aos encontrados neste trabalho foram demonstrados pelo Programa Microbiológico Americano de coleta de

dados referentes a cortes de frango (RCPBS). Esse programa não realiza a avaliação de frango a passarinho, já para perna, peito e asa, os percentuais de positividade foram 24,2%, 27,1% e 33,3%, respectivamente, no ano de 2012. A ocorrência total de *Salmonella* em cortes de aves relatada por esse programa foi de 26,3% (USDA/FSIS, 2012). Da mesma forma como ocorre no Brasil, nos EUA os dados de ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes e em carcaças de frango também diferem. Contrastando com a ocorrência em cortes de 26,3%, o PR/HACCP relatou, 7,2% de ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de aves, em 2009 (USDA/FSIS, 2013).

Oscar et al. (2010), ao avaliarem a distribuição da contaminação por *Salmonella* sp. em carcaças de frango, observaram que as asas foram as partes mais contaminadas, com maior isolamento do patógeno na asa esquerda (27,1%). No geral, os percentuais de ocorrência de *Salmonella* sp. foram 25,7% para asa, 17,5% para peito e 16% para perna (coxa e sobrecoxa). Os autores atribuíram a maior ocorrência de *Salmonella* sp. na asa esquerda à prática de remoção e colocação dos intestinos sobre o lado esquerdo da carcaça, para posterior inspeção.

Outra prática rotineira que pode contribuir para a maior presença de *Salmonella* sp. nas asas e no peito é a posição das aves durante o processo de evisceração, suspensas pelas pernas. As regiões do peito e das asas são as mais predispostas a entrar em contato com o material gastrointestinal quando falhas tecnológicas causam o rompimento das vísceras. Aliado à isso, as asa apresentam uma dificuldade extra no momento da inspeção e avaliação da presença de contaminação fecal/oral, devido ao seu formato e à sua disposição, bem próximo ao peito da aves.

A ocorrência de *Salmonella* sp. em cada região do Paraná está demonstrada na TABELA 6. A comparação estatística entre diferentes regiões do estado não foi realizada devido à grande variação no número de amostras, determinado pela metodologia de coleta.

Mesmo sem comparação estatística, percebe-se uma grande variação entre os percentuais de ocorrência de *Salmonella* sp. entre as diferentes regiões. As amostras provenientes da região metropolitana foram coletadas do único matadouro existente nessa região, localizado na cidade da Lapa, na região metropolitana de Curitiba. A presença de temperaturas mais frias durante o ano todo, pode ser um

dos contribuintes para a ausência de *Salmonella* sp. observada nessa região (LEE et al., 2016).

Como a erradicação de *Salmonella* sp. tanto nas granjas quanto nas indústrias é impraticável, a redução no risco de ocorrência de salmonelose deve ser também uma preocupação do consumidor. O correto acondicionamento da carne de aves, respeitando o período de validade, o descongelamento sob refrigeração, o cuidado para evitar a contaminação cruzada e o cozimento adequado são medidas que podem ser adotadas durante o preparo culinário desse alimento.

TABELA 6 - OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* SP. POR REGIÃO PRODUTORA DE CORTES CONGELADOS DE FRANGO NO ESTADO DO PARANÁ.

REGIÃO	AMOSTRAS COM <i>SALMONELLA</i> SP./ AMOSTRAS ANALISADAS	% DE AMOSTRAS COM <i>SALMONELLA</i> SP.
Norte Central	28/102	27,5
Oeste	24/60	40
Noroeste	21/43	48,8
Sudoeste	8/43	18,6
Norte Pioneiro	3/17	17,6
Centro Ocidental	7/17	41,2
Centro Oriental	4/9	44,4
Metropolitana	0/9	0
Total	95/300	31,7

FONTE: A autora (2017)

Considerando o atendimento das amostras à RDC nº 12 e o alto percentual de positividade para *Salmonella* sp., o preparo culinário da carne de aves assume grande importância na garantia da inocuidade dos alimentos, pois a eliminação de *Salmonella* sp. só poderá ser possível por meio de um cozimento adequado, atendendo ao binômio tempo-temperatura necessário para destruição do patógeno.

Vários modelos já foram descritos para determinar o tempo de tratamento térmico a que a carne de aves deve ser submetida para que ocorra inativação das células de *Salmonella* sp. viáveis (JARVIS et al., 2016). Porém, o modelo mais utilizado é expresso em valor-D, que é o tempo necessário, a determinada temperatura, para que ocorra a inativação de 90% da população bacteriana presente no alimento. Segundo Juneja et al. (2001) são necessários pelo menos 7 minutos a

58°C para que ocorra a redução de um ciclo logarítmico na população de *Salmonella* sp. presente na carne de aves.

5.5 PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SIMILARIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP.

Dos 98 isolados de *Salmonella* sp., somente cinco (5,1%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, entre esses, dois isolados de *S. Thompson*, um de *S. Typhimurium*, um de *S. Ndolo* e outro de *S. enterica* subsp. *enterica* (O:3,10:e,h:-). Os demais isolados foram resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos. Oito isolados foram resistentes a duas classes, 68 isolados a três classes e 17 isolados apresentaram resistência a quatro classes de antimicrobianos. (TABELA 7).

Dessa forma, 86,7% (85/98) dos isolados mostraram-se multirresistentes (MR), isto é, apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. Resultado idêntico foi descrito por Ziech et al. (2016b), os quais encontraram 86% dos isolados de *Salmonella* sp. isoladas de ambientes de abate de frango no Paraná, com fenótipo MR.

Salmonella sp. com fenótipos multirresistentes são um problema mundial enfrentado a cerca de 30 anos. Portanto, o monitoramento contínuo da sua prevalência e resistência em alimentos é necessário devido às implicações para a saúde pública e à potencial disseminação de micro-organismos resistentes. Além disso, o controle rigoroso no uso de agentes antimicrobianos na produção animal, o diagnóstico clínico e microbiológico precoce, o tratamento apropriado e a implementação de padrões sanitários rigorosos na indústria de alimentos são ações necessárias para reduzir significativamente o peso global da salmonelose na saúde humana (HUR et al., 2012).

O perfil mais prevalente entre os isolados multirresistentes foi a resistência a Ampicilina (AMP), Amoxicilina com Ácido Clavulânico (AMC), Doxiciclina (DOX), Tetraciclina (TET), Ácido Nalidíxico (NAL) e Ceftriaxone (CRO), observado em 37 isolados (37,8%) (QUADRO 5).

Todos os isolados (100%) foram sensíveis aos Carbapenêmicos (Meropenem e Imipenem), ao Cloranfenicol e ao aminoglicosídeo Amicacina (FIGURA 6). O fato de todos os isolados apresentarem sensibilidade aos

carbapenêmicos é um resultado importante, pois esses agentes são os de primeira escolha para combater infecções causadas por micro-organismo produtores de enzimas ESBL (VARDAKAS et al., 2012).

TABELA 7 - FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP. FRENTE ÀS CLASSES DE ANTIMICROBIANOS TESTADOS.

NÚMERO DE CLASSES COM RESISTÊNCIA	CLASSES DE ANTIMICROBIANOS	NÚMERO DE ISOLADOS	%
0	Sensível a todas as classes de antimicrobianos	05	5,1
1	-	-	-
	Aminoglicosídeos Tetraciclínas	01	1,0
2	Quinolonas Tetraciclínas	06	6,1
	Beta-lactâmicos Quinolonas	01	1,0
3	Beta-lactâmicos Quinolonas Tetraciclínas	67	68,5
	Beta-lactâmicos Aminoglicosídeos Tetraciclínas	01	1,0
	Beta-lactâmicos Aminoglicosídeos Tetraciclínas Quinolonas	14	14,3
4	Beta-lactâmicos Inibidores do folato Tetraciclínas Quinolonas	02	2,0
	Beta-lactâmicos Aminoglicosídeos Tetraciclínas Inibidores do folato	01	1,0
TOTAL		98	100

FONTE: A autora (2017)

Os maiores índices de resistência foram observados para Ácido Nalidíxico (95%), Tetraciclina (94%), Doxiciclina (94%), Ampicilina (87%), Amoxicilina com Ácido Clavulânico (84%), Ceftriaxone (79%) e Ciprofloxacina (76%). Resultados condizentes foram reportados no Brasil por Ribeiro et al. (2011), encontrando 90% dos isolados de *Salmonella* sp. resistentes a Tetraciclina, 70% ao Ácido Nalidíxico e 60% a Ampicilina. Na China, Yang et al. (2013) também relataram percentual

elevado de isolados de *Salmonella* sp. resistentes a esses três antimicrobianos, evidenciando a disseminação global de cepas resistentes a esses agentes.

Na TABELA 8 encontra-se a distribuição da resistência antimicrobiana por sorotipo de *Salmonella* sp.

A resistência ao Ácido Nalidíxico vem crescendo nos últimos anos. Em 1996, a resistência à esse antimicrobiano era encontrada em 0,4% das isolados de *Salmonella* sp. isoladas de carne de aves, em 2008 em aproximadamente 60% e atualmente, 95% (STEVENSON et al., 2007; YANG et al., 2013).

QUADRO 5 - FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DOS 98 ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP. OBTIDOS DE CORTES DE FRANGO FRENTE AOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS.

FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA	NÚMERO DE ISOLADOS	%
Sensível a todos os antimicrobianos testados	05	5,1
GEN, DOX, TET	01	1,0
DOX, TET, NAL	06	6,1
AMP, AMC, TET, NAL	01	1,0
AMP, AMC, NAL, CRO	01	1,0
AMC, GEN, DOX, NAL, TOB	01	1,0
AMP, AMC, DOX, TET, NAL	15	15,3
AMP, AMC, TET, NAL, CRO	06	6,1
AMP, AMC, DOX, TET, NAL, CRO	37	37,8
AMP, AMC, DOX, TET, NAL, SUT	01	1,0
AMP, AMC, NAL, CRO, DOX, TET, TOB	01	1,0
AMP, GEN, DOX, TET, SUT, TOB, ATM	01	1,0
AMP, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	02	2,0
AMP, GEN, DOX, TET, CRO, CPM, ATM	01	1,0
AMP, AMC, DOX, TET, CIP, NAL, CRO	03	3,0
AMP, AMC, DOX, TET, NAL, SUT, CRO	01	1,0
AMP, AMC, DOX, TET, NAL, CRO, ATM	03	3,0
AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	09	9,2
AMP, AMC, DOX, TET, CIP, NAL, TOB, CRO	01	1,0
AMP, AMC, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	01	1,0
AMP, AMC, DOX, TET, NAL, TOB, CRO, CPM, ATM	01	1,0

AMC: Amoxicilina com ácido clavulânico; AMP: Ampicilina; ATM: Aztreonam; CIP: Ciprofloxacina; CPM: Cefepime; CRO: Ceftriaxone; DOX: Doxícilina; GEN: Gentamicina; NAL: Ácido Nalidíxico; SUT: Sulfametoxazol com Trimetoprim; TET: Tetraciclina; TOB: Tobramicina.

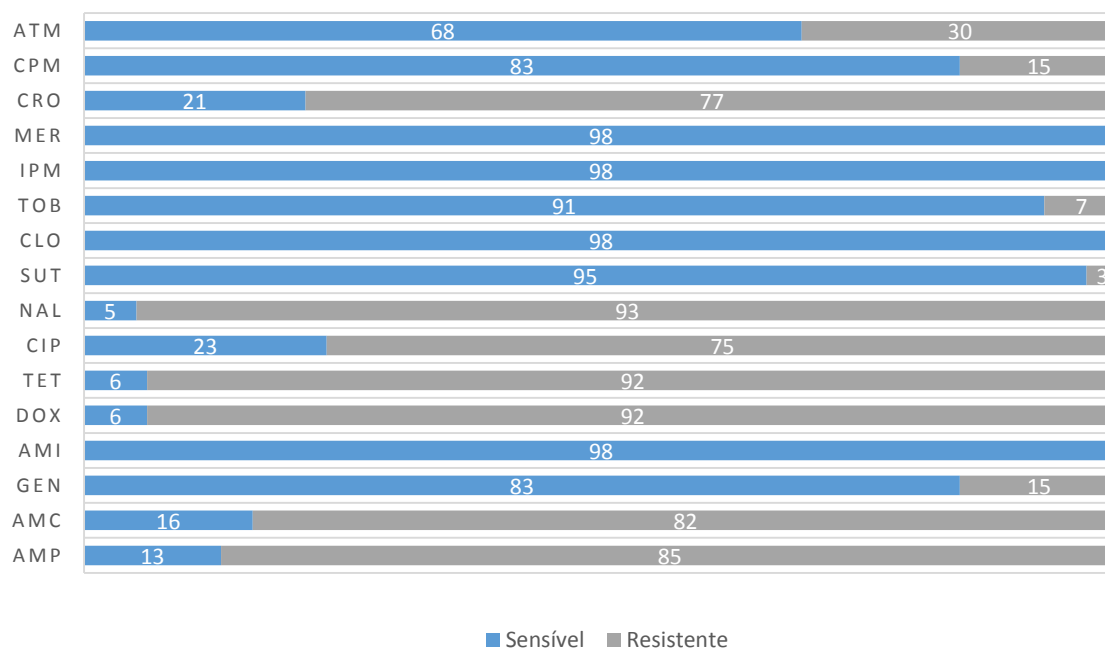
FONTE: A autora (2017)

Para Ciprofloxacina (CIP), a maioria dos 98 isolados apresentou resistência intermediária, observada em 71 deles (72,5%). Até 2011, a norma M100-S21 (CLSI, 2011), determinava que os isolados que apresentavam halos de inibição de 16 a 20

milímetros para Ciprofloxacina deveriam ser classificadas como intermediárias, sendo esse valor válido para todas as enterobactérias. A partir de 2012, com a publicação da norma M100-S22 (CLSI, 2012), esse valor continuou válido para as demais enterobactérias, excluindo-se *Salmonella* sp. Os isolados de *Salmonella* passaram a ser classificadas como intermediários quando apresentavam halos de 21 a 30 milímetros para Ciprofloxacina.

Essa modificação pode estar relacionada ao aumento dos perfis de resistência às Quinolonas, especialmente à Ciprofloxacina, observados em isolados de *Salmonella* sp. nos últimos anos (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2015). Essa resistência têm sido atribuída principalmente a mutações nos genes que codificam a DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) ou a topoisomerase (*parC* e *parE*), impedindo que a droga atue sobre essas enzimas (CASIN et al., 2003; EAVES et al., 2004; PARRY; THRELFALL, 2008).

FIGURA 6 - QUANTIDADE DE ISOALDOS DE *SALMONELLA* SP. SENSÍVEIS E RESISTENTES A CADA AGENTE ANTIMICROBIANO TESTADO.



Cepas que apresentaram resistência intermediária foram classificadas como resistentes.

ATM: Aztreonam; CPM: Cefepime; CRO: Ceftriaxone; MER: Meropenem; IPM: Imipenem; TOB: Tobramicina; CLO: Cloranfenicol; SUT: Sulfametoxazol com Trimetoprim; NAL: Ácido Nalidíxico; CIP: Ciprofloxacina; TET: Tetraciclina; DOX: Doxiciclina; AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina; AMC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico; AMP: Ampicilina.

FONTE: A autora (2017)

Todos os 98 isolados apresentaram os genes de resistência ao Trimetoprim (*Z0055*) e ao Sulfametoxazol (*sul2*). Porém, somente três foram fenotipicamente resistentes à combinação de Sulfametoxazol com Trimetoprim (SUT). Apesar dos

demais isolados não terem apresentado resistência quando testados para SUT, eles possuem potencial para expressar esses genes e tornarem-se resistentes. O gene *sul1*, também de resistência ao sulfametoxazol, foi encontrado somente em 16 isolados.

O gene de resistência ao Cloranfenicol (*catA*) não foi encontrado, mostrando que nenhum isolado tem potencial para expressar resistência a esse antimicrobiano. No Brasil, a resistência de isolados de *Salmonella* sp. frente ao Cloranfenicol vem diminuindo desde 1998, quando esse antimicrobiano foi proibido para uso em animais de produção (BRASIL, 1998). Em 2003, Cortez et al. (2006) identificaram 27,6% dos isolados de *Salmonella* sp. resistentes ao Cloranfenicol. Scur et al. (2014) ao testarem cepas isoladas entre 2006 e 2010, encontraram somente 9,8% dos isolados resistentes. Ziech et al. (2016b), em 2013, encontraram 3% de isolados resistentes e, no presente trabalho, todos os isolados de *Salmonella* sp. foram sensíveis ao Cloranfenicol.

Os genes de resistência a Tetraciclina, *tetA* e *tetB1*, não foram identificados nas mesmas proporções nos 98 isolados. O gene *tetA* estava presente em todos os isolados, com exceção daqueles sensíveis a todos os antimicrobianos. O gene *tetB1*, por outro lado, estava presente somente em 12 isolados.

Dos 98 isolados, 77 apresentaram resistência a um ou ambos agentes Beta-lactâmicos, Ceftriaxone ou Cefepime, sendo submetidos a triagem para produção de enzimas ESBL. Após essa triagem, treze isolados apresentaram padrão fenotípico compatível com a produção dessas enzimas (FIGURA 7). Esses 13 isolados foram então submetidos à PCR para verificação dos genes responsáveis pela expressão das enzimas ESBL.

Os treze isolados apresentaram o gene *bla_{CTX-M}* e três deles demonstraram possuir, além do gene *bla_{CTX-M}*, o gene *bla_{TEM}* (FIGURA 8). A associação entre esses dois genes em isolados de *Salmonella* sp. no Brasil já havia sido reportada por Peirano et al. (2006).

Nos 13 isolados onde foi identificada a presença do gene *bla_{CTX-M}*, seis pertenciam ao sorotipo Typhimurium, quatro ao Heidelberg e três ao sorotipo Ndolo. O gene *bla_{TEM}* estava presente em dois isolados de *S. Typhimurium* e em um de *S. Heidelberg* (TABELA 10). O sequenciamento dos genes *bla_{CTX-M}* e *bla_{TEM}* mostrou se tratar de *bla_{CTX-M-2}* e *bla_{TEM-1}*, em todos casos.

TABELA 8 - RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS SOROTIPOS DE *SALMONELLA* SP. ISOLADOS DE CORTES DE FRANGO PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 2015 E 2016.

SOROTIPO	NÚMERO DE ISOLADOS	NÚMERO DE AMOSTRAS RESISTENTES AO AGENTE ANTIMICROBIANO															
		AMC	ATM	AMP	CPM	CRO	MER	IPM	TOB	CLO	SUT	NAL	CIP	TET	DOX	AMI	GEN
Typhimurium	42	36	12	38	6	34	-	-	2	-	2	41	35	40	40	-	5
Heidelberg	38	35	12	35	5	33	-	-	4	-	-	38	30	38	38	-	4
Ndolo	6	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	5	5	5	5	-	5
Minnesota	4	3	1	4	-	2	-	-	1	-	1	4	2	4	4	-	1
O:4,5	2	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	2	1	2	2	-	-
Thompson	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Schwarzengrund	2	2	1	2	-	2	-	-	-	-	-	2	2	2	2	-	-
O:3,10:e,h:-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abony	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-
TOTAL	98	82	30	85	15	77	-	-	7	-	3	93	75	92	92	-	15

ATM: Aztreonam; CPM: Cefepime; CRO: Ceftriaxone; MER: Meropenem; IPM: Imipenem; TOB: Tobramicina; CLO: Cloranfenicol; SUT: Sulfametoxazol com Trimetoprim; NAL: Ácido Nalidíxico; CIP: Ciprofloxacina; TET: Tetraciclina; DOX: Doxiciclina; AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina; AMC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico; AMP: Ampicilina.

FONTE: A autora (2017)

FIGURA 7 - TESTE DE TRIAGEM FENOTÍPICA PARA PRESENÇA DE ENZIMAS ESBL EM ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP.

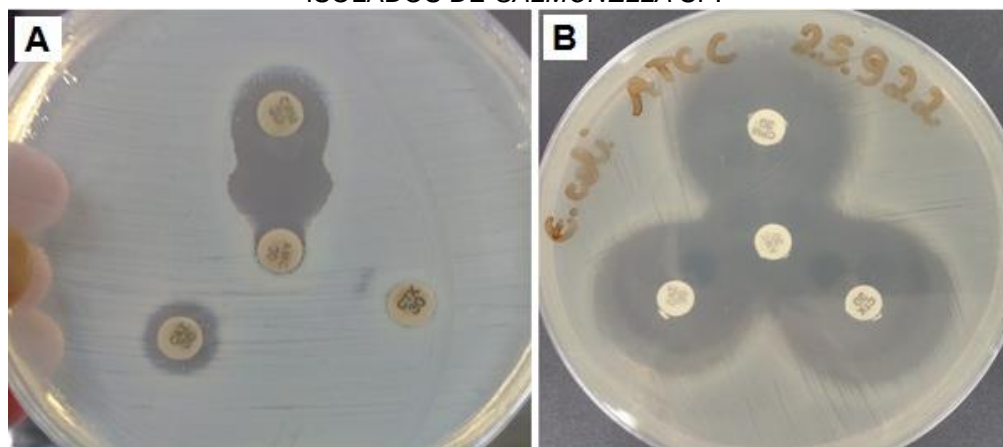
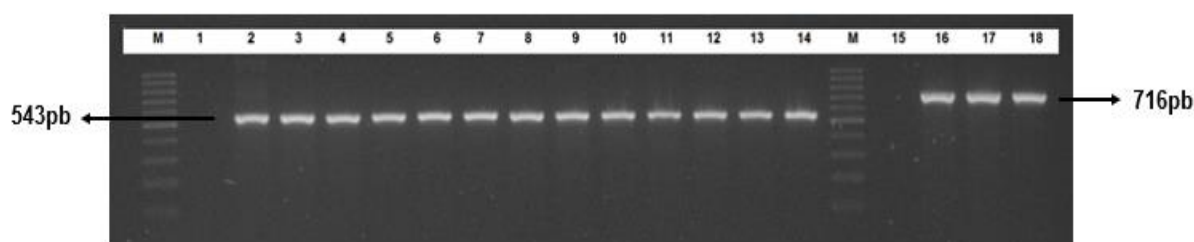


Figura A - Isolado se *Salmonella* sp. positivo para produção de enzimas ESBL; Figura B – Controle negativo do teste (*Escherichia coli* ATCC 25.922).

FONTE: A autora (2017)

FIGURA 8 - GEL DE PCR CONFIRMANDO A PRESENÇA DOS GENES *BLA_{CTX-M}* E *BLA_{TEM}* EM ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP. POSITIVOS NA TRIAGEM FENOTÍPICA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS ESBL.



M – marcador de peso molecular de 100pb; 1 a 14 – gene *bla_{CTX-M}* (1 – controle negativo; 2 - amostra 6; 3 – amostra 12; 4 – amostra 13; 5 – amostra 14; 6 – amostra 35; 7- amostra 38; 8 – amostra 48; 9 – amostra 50; 10 – amostra 85; 11 - amostra 87; 12 – amostra 88; 13 - amostra 89; 14 – amostra 94; 15 a 18 – gene *bla_{TEM}* (15 – controle negativo; 16 – amostra 14; 17 – amostra 48; 18 – amostra 50).

FONTE: A autora (2017)

A atual pandemia das enzimas CTX-M é uma das principais causas de resistência aos beta-lactâmicos e um dos principais desafios para o tratamento antimicrobiano de infecções causadas por enterobactérias em todo o mundo (WOERTHER et al., 2013). No Brasil, CTX-M estão entre os principais tipos de ESBL identificados em *Salmonella* isoladas de aves. Fitch et al. (2016) analisaram cepas isoladas entre os anos 2004 e 2011 pelo Programa de Redução de Patógenos, provenientes de todo país, e observaram predominância do gene *bla_{CTX-M-2}*. Além disso, também foram encontrados *bla_{CTX-M-8}* e, pela primeira vez no país, os genes *bla_{CTX-M-1}* e *bla_{CTX-M-14}*. Assim como no presente trabalho, os autores também relataram a presença de *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* carreando o gene *bla_{CTX-M-2}* e de *S. Heidelberg* carreando o gene *bla_{TEM}* no estado do Paraná.

Além dos isolamentos em aves e amostras do seu ambiente de criação, no Brasil, já foi identificada a presença de *Salmonella* Typhimurium carreando o gene *bla*_{CTX-M-2} em paciente pediátricos (FERNANDES et al., 2009). As enzimas ESBL do tipo CTX-M são mediadas por plasmídeos e responsáveis pela hidrólise dos antimicrobianos Cefotaxime e Ceftriaxone.

O gene *bla*_{TEM-1} também já foi relatado em isolados de *Salmonella* no Brasil (PEIRANO et al, 2006; RIBEIRO et al., 2011). Apesar dos 13 isolados produtores de ESBL terem apresentado resistência à Ampicilina, em apenas três deles essa resistência foi atribuída as enzimas ESBL do tipo TEM-1. Nos demais isolados podem estar presentes outros genes, como PSE-1 por exemplo, também relacionado a resistência a Ampicilina e bastante comum em *Salmonella* sp. (GÜERRI et al., 2004; BIENDO et al., 2005).

O aparecimento, cada vez maior, de mecanismos de resistência aos antimicrobianos já conhecidos força a medicina veterinária e humana a buscar novas alternativas para prevenção e tratamento das infecções humanas por *Salmonella* sp. Uma das novidades no campo médico é o desenvolvimento de vacinas mono e bivalentes contra *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (TENNANT et al., 2016). Ferramentas como essa tornam-se fundamentais principalmente para pacientes dos grupos de risco, nos quais falhas nos protocolos antimicrobianos podem determinar a morte do indivíduo.

Os perfis de macrorrestrição dos 98 isolados de *Salmonella* sp. analisados estão demonstrados na FIGURA 9, juntamente com seu perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e o sorotipo a que pertence cada isolado. Empregando-se a enzima de restrição *Xba*I, os 98 isolados foram agrupados em 5 *clusters* e 11 pulsotipos. O *cluster* 1 foi composto por 69 isolados, o *cluster* 2 por 11 isolados, o *cluster* 3 por três isolados, os *clusters* 4 e 5 por dois isolados cada. Os demais isolados não formaram *clusters*, constituindo 11 diferentes pulsotipos.

O *cluster* 1 foi composto em sua maioria pelos sorotipos *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*, mas também apresentou *S. Minnesota*, *S. Schwarzengrund*, *S. Abony* e o sorotipo O:4,5 em sua composição. Os isolados desse *cluster* pertenciam a seis das oito regiões avaliadas, Oeste, Norte Central, centro Ocidental, Noroeste, Sudoeste e Centro Oriental. Alguns isolados, apesar da diferença de sorotipo, apresentaram perfis de macrorrestrição idênticos (100%). Segundo o CDC (2011),

essa ocorrência não é incomum, já que diferentes sorotipos de *Salmonella* sp. podem apresentar relação fenotípica e genética.

No *cluster* 2, os 11 isolados relacionados pertenciam a dois sorotipos, *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*, e possuíam somente duas regiões de origem, Oeste e Norte Central. Nestas duas regiões é onde se encontram a maioria dos matadouros de aves do Paraná (19 dos 35). Apesar da ausência de contato geográfico entre a região Oeste e a região Norte Central, os isolados do *cluster* 2 apresentaram similaridade genética $\geq 90\%$.

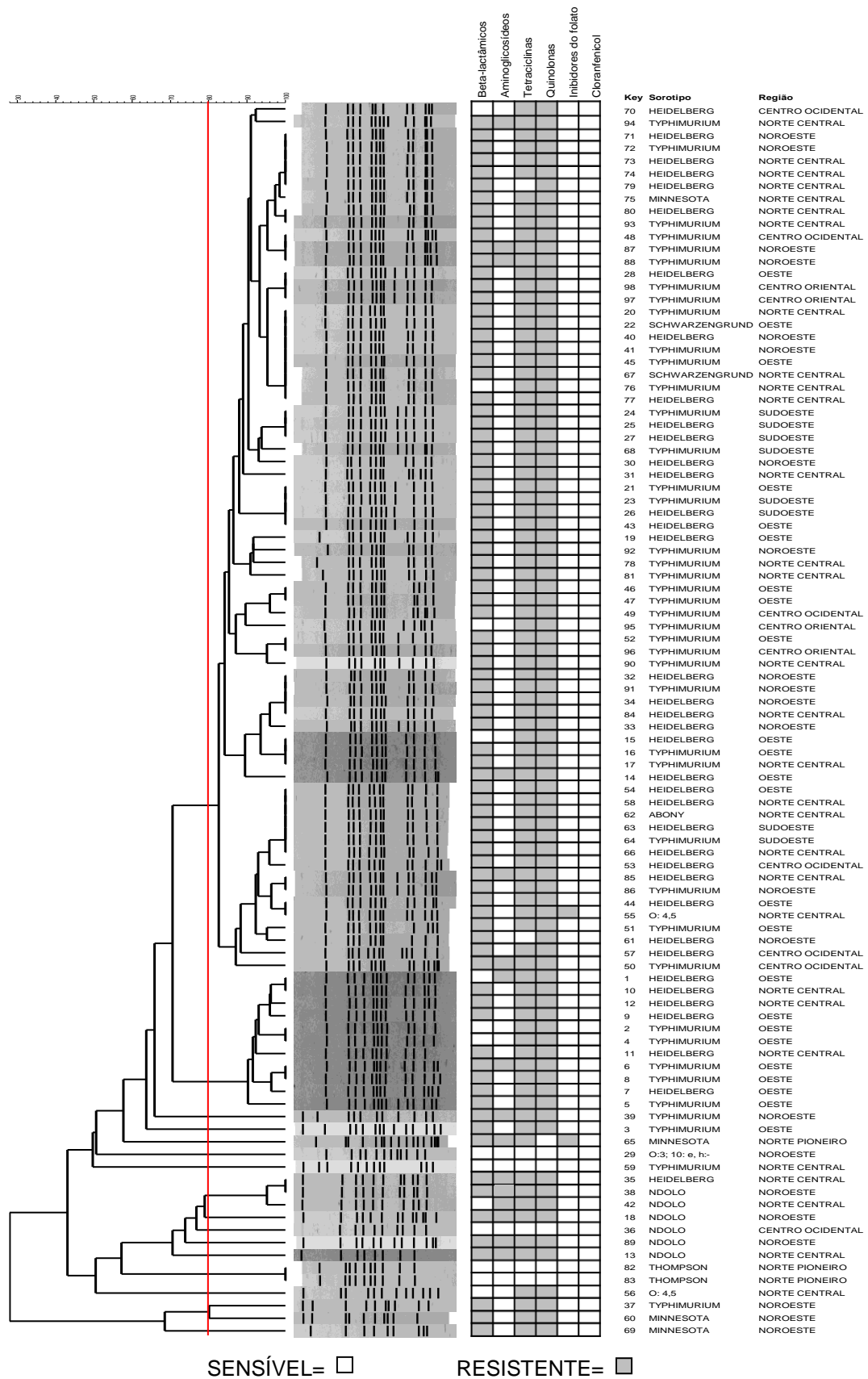
O *cluster* 3 foi formado por dois isolados de *S. Ndolo* (Noroeste e Norte Central) e um de *S. Heidelberg* (Norte Central). Os isolados de *S. Heidelberg* (Norte Central) e *S. Ndolo* (Noroeste) apresentaram 100% de similaridade genética e também 100% de correspondência entre seus perfis de sensibilidade a antimicrobianos. O outro isolado de *S. Ndolo* (Norte Central) apresentou perfil de resistência a antimicrobianos diferente dos outros dois isolados, apesar da similaridade genética entre elas ter sido 95%.

O *cluster* 4 foi composto pelos dois isolados de *S. Thompson* identificados na região Norte Pioneiro. Além de apresentarem o mesmo perfil genético, os dois isolados também demonstraram o mesmo perfil de resistência aos antimicrobianos, sendo sensíveis a todos os agentes testados. Esses dois isolados foram provenientes de duas amostras diferentes obtidas de uma mesma indústria, evidenciando uma fonte comum de contaminação.

O *cluster* 5 agrupou dois sorotipos distintos, *S. Typhimurium* e *S. Minnesota*, ambos provenientes do mesmo matadouro, na região Noroeste. Apesar de serem sorologicamente distintos, esses dois isolados apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade a antimicrobianos e cerca de 80% de similaridade genética.

A presença de perfis clonais idênticos em variadas regiões pode sugerir a circulação da mesma cepa de *Salmonella* sp. entre as diferentes regiões do estado do Paraná. A disseminação dentro do estado pode ocorrer devido a compra de material genético, de matérias-primas e outros insumos contendo *Salmonella* sp., podendo ser originários do próprio estado ou terem vindo de outros locais.

FIGURA 9 - DENDOGRAMA, OBTIDO POR MEIO DE PFGE (XBAI), INDICANDO A RELAÇÃO GENÉTICA E O PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DOS 98 ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP. OBTIDOS DE CORTES DE FRANGO PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ.



FONTE: A autora (2017)

5.6 SOROTIPAGEM

Foram identificados nove sorotipos diferentes de *Salmonella* sp. dentre os 98 isolados avaliados. Os sorotipos mais prevalentes em carne de aves no estado do Paraná foram Typhimurium e Heidelberg, com 42 e 38 isolados identificados, respectivamente. Em menor número também foram identificados os sorotipos Ndolo (6), Minnesota (4), O:4,5 (2), Thompson (2), Schwarzengrund (2), O:3, 10:e, h:- (1) e Abony (1) (TABELA 9). Nas três amostras onde foi identificado mais de um sorotipo, foram encontradas as associações de *S. Heidelberg* com *S. Ndolo*, *S. Typhimurium* com *S. Ndolo* e *S. Heidelberg* com *S. Typhimurium*.

TABELA 9 - SOROTIPOS DE *SALMONELLA* SP. ENCONTRADOS EM CORTES DE FRANGOS PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 2015 E 2016.

SOROTIPO	NÚMERO DE AMOSTRAS	%
<i>Salmonella</i> Typhimurium	42	43
<i>Salmonella</i> Heidelberg	38	39
<i>Salmonella</i> Ndolo	6	6
<i>Salmonella</i> Minnesota	4	4
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)	2	2
<i>Salmonella</i> Thompson	2	2
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	2	2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:3,10:e,h:-)	1	1
<i>Salmonella</i> Abony	1	1
TOTAL	98	100

FONTE: A autora (2017)

Os dados oficiais do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), publicados por Medeiros et al. (2011), mostraram que os sorotipos mais prevalentes em carcaças de frango no Brasil, entre 2004 e 2006, foram Enteritidis, Infantis, Typhimurium e Heidelberg. Apesar de terem passados dez anos e a presente pesquisa ter sido realizada somente no estado do Paraná, observa-se que os sorotipos Typhimurium e Heidelberg ainda continuam aparecendo em destaque. É importante salientar que os sorotipos Ndolo, terceiro mais prevalente no estado do Paraná, Thompson e Abony não foram encontrados na pesquisa de Medeiros et al. (2011). Além disso, o sorotipo Enteritidis, responsável por quase metade dos sorotipos nacionais identificados pelo PREBAF, não foi isolado em nenhuma amostra no estado do Paraná.

Entre 2009 e 2010, Voss-Rech et al. (2015) analisaram 1.543 *swabs* provenientes de ambientes de criação de aves nos estados de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul. No estado do Paraná os pesquisadores encontraram 13 diferentes sorotipo, com predominância de *Salmonella* Infantis, presente em 34,5% das amostras analisadas. Já em Santa Catarina e no Mato Grosso do Sul, os sorotipos mais encontrados foram *S. Senftenberg* e *S. Minnesota*, respectivamente. Em nenhum dos três estados foi identificada *S. Enteritidis*.

No trabalho desenvolvido por PANDINI et al. (2014), em granjas avícolas no Paraná os sorotipos de *Salmonella* mais comumente encontrados, no período de 2010 a 2011, foram *S. Heidelberg*, *S. Mbandaka* e *S. Newport*.

Em outro trabalho desenvolvido na região sul do Brasil, onde foram analisadas amostras de 21 lotes de frango e 17 pontos diferentes em sete matadouros (totalizando 1.071 amostras), os sorotipos de *Salmonella* identificados foram Anatum, Brandenburg, Agona, Tennessee, Bredeney, Schwarzengrund e Infantis (MION et al., 2016). Esse trabalho não descreve em qual ano as amostras foram coletadas e analisadas, entretanto, somente *S. Schwarzengrund* coincidiu com os isolados do presente trabalho, analisados entre 2015 e 2016.

Essa diferença regional na distribuição dos sorotipos também foi demonstrada por Yang et al. (2013), na China, em carcaças e cortes de frango coletados em 2008. Nas três diferentes regiões avaliadas, *S. Enteritidis* foi a mais prevalente, entretanto, os demais sorotipos encontrados diferiram muito entre uma região e outra.

Isso demonstra a existência de uma variação geográfica e temporal na distribuição dos sorotipos de *Salmonella* sp. No Brasil, até o início dos anos 2000, o principal sorotipo descrito em amostras de carne de frango era *S. Enteritidis*, com percentuais chegando a até 84%, quando comparado aos demais sorotipos (COSTA et al., 1997; SANTOS et al., 2000; KANASHIRO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007; DUARTE et al., 2009; CAPALONGA et al., 2014). Esse sorotipo se sobressaiu no país após os sorotipos Gallinarum e Pullorum terem sido controlados, reflexo da exclusão competitiva destes sorotipos sobre *S. Enteritidis* (RABSCH et al., 2000).

Nos anos seguintes, o sorotipo Enteritidis passou a declinar no país. Dados compilados por Kottwitz et al. (2013) mostram que a ocorrência de *S. Enteritidis* em amostras biológicas de frango caiu de 77% em 2006 para 9% em 2010, enquanto que a ocorrência dos demais sorovares aumentou de 23% para 91% no mesmo

período. Trabalhos realizados em anos posteriores demonstram a ausência de *S. Enteritidis*, assim como foi observado neste trabalho (VOSS-RECH et al., 2015; MION et al., 2016).

Esse comportamento provavelmente é reflexo da implantação de Programas Nacionais de controle de *Salmonella* sp., especialmente do PNSA. Esse programa determinou o abate de matrizes portadoras de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e a vacinação dos lotes de aves reprodutoras com vacinas inativadas contra *S. Enteritidis*. Essa imunoprofilaxia iniciou em 2003 e pode ter ajudado na redução da prevalência desse sorotipo em frangos de corte (BRASIL, 2003a).

Com *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Enteritidis* sob controle, novos sorotipos encontraram condições favoráveis para sua manutenção no ambiente de criação avícola. Um desses sorotipos foi *S. Typhimurium*, também alvo do PNSA, porém sem nenhuma ação específica para seu controle. Além de *S. Typhimurium*, outros sorotipos também começaram a reemergir. De acordo com dados do Laboratório São Camilo (Maringá, Paraná, Brasil), 3,5% das amostras de carne de aves analisadas no ano de 2009, provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, tinham *Salmonella* sp. Nessas amostras, os sorotipos mais prevalentes foram Minnesota (73%) e Mbandaka (33%) (KOTTWITZ et al., 2013).

Como a dinâmica de ocorrência dos sorotipos não é homogênea, em alguns países, como EUA, França e Egito, *S. Enteritidis* ainda está entre os três sorotipos mais encontrados em aves e carne de aves (INSTITUTO PASTEUR, 2013; CDC, 2014a; MOUSSA et al., 2014). Nos EUA, o isolamento de *S. Enteritidis* em pacientes com salmonelose aumentou 41% entre 2003 e 2013 (CDC, 2013).

O sorotipo Ndolo possui raros relatos de sua ocorrência do Brasil, sendo todos reportados antes de 1982. Leal et al. (1987) descreveram a presença desse sorotipo em isolados humanos nos anos de 1978 a 1980. Hofer et al. (2000), ao analisarem 19.238 amostras de carne de cavalos abatidos entre 1980 e 1982, no estado de Pernambuco, identificaram a presença do sorotipo Ndolo em três amostras no ano de 1981.

Não existe nenhum relato no país sobre a ocorrência de *S. Ndolo* em carne de aves. Apesar do baixo número de amostras identificadas pertencentes a esse sorotipo (6), ele foi o terceiro mais prevalente, demonstrando sua emergência no estado do Paraná. Fato preocupante é que, apesar da emergência, metade dos isolados de *S. Ndolo* (3) apresentaram fenótipos MR e genes que codificam enzimas

ESBL (TABELA 10). Esses três isolados foram obtidos de amostras provenientes das regiões Noroeste e Norte Central do Paraná, que estão entre as três regiões com maior número de matadouros no estado.

Os outros dois sorotipos de *Salmonella* identificados possuindo fenótipos MR e genes que codificam ESBL foram Typhimurium (seis isolados) e Heidelberg (quatro isolados). Esses dois sorotipos estão entre os mais detectados em frangos e também fazem parte do grupo dos cinco sorotipos que mais têm relação com salmonelose humana. Comparando com outros sorotipos que causam gastroenterite moderada e auto limitante, *S. Heidelberg* preocupa mais, pois costuma causar infecções invasivas (FOLEY et al., 2011; CDC, 2013).

Monitoramentos como esse são importantes na avicultura paranaense, pois cerca de um terço da produção de carne de frango do estado é exportada (SINDIAVIPAR, 2015a; AVICULTURA INDUSTRIAL, 2016). Isso faz com que os dados encontrados tornem-se um problema global, e não somente estadual, já que os produtos aqui produzidos são consumidos em mais de 150 países (SINDIAVIPAR, 2016b).

TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS DE *SALMONELLA* SP. PRODUTORAS DE ENZIMAS ESBL OBTIDOS DE CORTES DE FRANGO PRODUZIDOS NO ESTADO DO PARANÁ.

NÚMERO DA AMOSTRA	SOROTIPO	PADRÃO DE RESISTÊNCIA	MULTIRRESISTÊNCIA	TIPO DE ESBL	REGIÃO DE PROCEDÊNCIA	TIPO DE CORTE
6	Typhimurium	AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Oeste	Meio da asa
12 ⁽¹⁾	Heidelberg	AMP, AMC, DOX, TET, NAL, TOB, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Norte Central	Coxinha da asa
13 ⁽¹⁾	Ndolo	AMP, GEN, DOX, TET, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Norte Central	Coxinha da asa
14	Heidelberg	AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2 TEM-1	Oeste	Frango a passarinho
35	Heidelberg	AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Norte Central	Peito
38	Ndolo	AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Noroeste	Coxa e sobrecoxa
48	Typhimurium	AMP, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2 TEM-1	Centro Ocidental	Meio da asa
50	Typhimurium	AMP, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2 TEM-1	Centro Ocidental	Meio da asa
85	Heidelberg	AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Norte Central	Frango a passarinho
87	Typhimurium	AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Noroeste	Peito

88	Typhimurium	AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Noroeste	Peito
89	Ndolo	AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Noroeste	Peito
94	Typhimurium	AMP, GEN, DOX, TET, NAL, CRO, CPM, ATM	SIM	CTX-M-2	Norte Central	Frango a passarinho

ATM: Aztreonam; CPM: Cefepime; CRO: Ceftriaxone; TOB: Tobramicina; NAL: Ácido Nalidixico; TET: Tetraciclina; DOX: Doxíciclina; GEN: Gentamicina; AMC: Amoxicilina com ácido clavulânico; AMP: Ampicilina.

⁽¹⁾ Isolados da mesma amostra.

FONTE: A autora (2017)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O percentual encontrado de não conformidades em embalagens e rotulagens foi considerado elevado, por se tratar de estabelecimentos industriais submetidos à fiscalização do Serviço de Inspeção Federal e importantes produtores de carne de aves para o Brasil e para o exterior. Cabe às indústrias a responsabilidade pelo conhecimento e o cumprimento das regulamentações no tocante à embalagem e rotulagem, objetivando reduzir irregularidade e também o risco de ocorrência de perigos biológicos, químicos e físicos ao consumidor. Além disso, a presença de não conformidades pode ser fator determinante na redução da confiabilidade dos consumidores pela indústria.

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram não haver associação entre a presença de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. em carne de aves. Isso reforça a ideia de que a relação entre esses dois grupos de micro-organismos nem sempre é positiva, e que a avaliação de patógenos em carne de aves não deve ser negligenciada.

A quantidade de células de *Salmonella* sp. presentes nas amostras de cortes de frango foi baixa. Somente após a introdução de um volume de amostra adicional é que foram obtidas amostras em condições de quantificação. Assim, observa-se que essa metodologia não apresenta resultados satisfatórios para quantificação de *Salmonella* sp. em carne de aves, uma vez que esses produtos geralmente apresentam carga contaminante muito baixa.

Mesmo com todas as medidas preventivas adotadas ao longo da cadeia produtiva, a ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de frango produzidos no estado do Paraná foi considerada elevada. Associado à ocorrência elevada, a presença de isolados MR e produtores de ESBL é preocupante devido ao Paraná ser o maior estado exportador de carne de aves do Brasil.

A ausência de identificação do sorotipo Enteritidis mostra que os programas de controle sobre esse sorotipo estão apresentando bons resultados. Entretanto, a emergência e reemergência de novos sorotipos faz com que a prevalência de *Salmonella* sp. ainda continue elevada na cadeia avícola.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; LERTWORAPREECHA, M.; EVANS, M. C.; BANGTRAKULNONT, A.; CHELERMCHAIKIT, T.; HENDRIKSEN, R. S.; WEGENER, H. C. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 715–718, 2003.
- ABE, K.; SAITO, N.; KASUGA, F.; YAMAMOTO, S. Prolonged Incubation Period of Salmonellosis Associated with Low Bacterial Doses. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2735-2740, 2004.
- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2016. 2016b. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em 16 de jan de 2017.
- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Saldo das exportações de carne de frango segue positivo em 2016. 2016a. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/saldo-das-exportacoes-de-carne-de-frango-segue-positivo-em-2016-1882>>. Acesso em 1 de dez de 2016.
- ADAMS, M.; MOTARJEMI, Y. **Organização Mundial da Saúde: Segurança básica dos alimentos para profissionais de saúde**. São Paulo: Roca, 2002.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.
- ARLET, G.; BARRETT, T. J.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; MULVEY, M. R.; WHITE, D. G. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. **Microbes and Infection**, v.8, n.7, p. 1945-1954, 2006.
- AVICULTURA INDUSTRIAL. Produção – Paraná abate 3 mil frangos por minuto. 2016. Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/parana-abate-3-mil-frangos-por-minuto/20160128-134528-d473>>. Acesso em 1 de dez. de 2016.
- BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (BAM). **United States Food and Drug Administration and Association of Official Analytical Chemists International**. 7th ed. Arlington, 1992. 529 p.
- BASTOS, A. A.; BELINELLO, M. H.; SARAIVA, T. C.; SOUTO, A. C. Avaliação da qualidade sanitária dos rótulos de alimentos embalados de origem animal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 32, n. 2, p. 218-231, 2008.
- BATCHELOR, M.; HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; STALLWOOD, A. D.; DAVIES, R. H.; LIEBANA, E. Characterization of AmpC-Mediated Resistance in Clinical *Salmonella* Isolates Recovered from Humans during the Period 1992 to 2003 in England and Wales. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2261–2265, 2005.

BAU, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BAUERNFEIND, A.; STEMLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; ERNST, S.; CASELLAS, J.M. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 509–513, 1996.

BAUMAN, R. W. Microbial Genetics. In: **Microbiology**. 2nd ed. San Francisco: Pearson, 2009. p. 197-328.

BELAAOUAJ, A.; LAPOUMEROULIE, C.; CANIÇA, M. M.; VEDEL, G.; NÉVOT, P.; KRISHNAMOORTHY, R.; PAUL, G. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). **FEMS microbiology letters**, v. 120, n. 1-2, p. 75–80, 1994.

BEYENE, G.; NAIR, S.; ASRAT, D.; MENGISTU, Y.; ENGERS, H.; WAIN, J. Multidrug resistant *Salmonella* Concord is a major cause of salmonellosis in children in Ethiopia. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 1, p. 23–33, 2011.

BIENDO, M.; LAURANS, G.; THOMAS, D.; CANARELLI, B.; HAMDAD-DAOUDI, F.; ROUSSEAU, F.; CASTELAIN, S.; EB, F. Molecular characterization and mechanisms of resistance of multidrug-resistant human *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Amiens (France). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 3, p. 219-229, 2005.

BONDE, G. L. Bacteriological methods for estimation of water pollution. **Health Laboratory Science**, v. 3, n. 2, p. 124-128, 1966.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001a. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 13, de 02 de janeiro de 2001b. Aprova o Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carne de Aves e Seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados, em Anexo. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro 2004. A Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003c. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 10.406, de 10 de janeiro de 2002. Institui o Código Civil. **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016a. Controle e monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no serviço de inspeção federal (SIF). **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005. Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal Embalado. **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003d. Dispõe sobre os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003b. Institui o Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003a. Aprovar as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium, em anexo. **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica. Divulgação dos resultados do banco de dados gerado a partir da implantação da Instrução Normativa nº 70, de 6 de outubro de 2003. 2010. **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da DAS e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 448, de 10 de setembro de 1998. Dispõe sobre a proibição de fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações, e de aditivos alimentares que especifica e revoga a portaria que menciona. **Diário Oficial da União.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016c. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde

pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2016b.

BRIZIO, A. P.; ANDRADE, B. A.; PRETINCE, C. Carcaças de Frango Resfriadas: Estudo Sobre a Prevalência de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *Campylobacter* spp. In: **Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene**, v.1, n.1, p. 369-370, 2014.

CALVO, J.; MARTÍNEZ, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 27, n. 1, p. 44-52, 2009.

CAPALONGA, R.; RAMOS, R. C.; BOTH, J. M. C.; SOEIRO, M. L.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; TONDO, E. C. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. **Journal of Infection in Developing Countries**. v. 8, n. 7, p. 811-817, 2014.

CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M.; STOPPA, G. F. Z.; CASTRO, A. G. M.; LUCIANO, R. L.; TESSARI, E. N. C. Eficiência de metodologias de preparo de amostra para pesquisa de *Salmonella* e contagem de mesófilos em carcaças de frango. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 22, n. 1, 2014.

CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M.; STOPPA, G. F. Z.; CASTRO, A. G. M.; LUCIANO, R. L.; TESSARI, E. N. C. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 0, 2015.

CARDOSO, A. L. S. P.; MACHADO, A. G.; TESSARI, E. N. C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e cortes de frango. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 144-150, 2005.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I. Pesquisa de *Salmonella* sp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 67, n. 1, p. 25-30, 2000.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L.; SALOTTI, B. M.; BURGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Presença de microrganismos mesófilos, psicrótrófos e

coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 303-307, 2005.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. **Ars Veterinária**, v.19, n.1, p. 57–62, 2003.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465–1468, 2005.

CASIN, I.; BREUIL, J.; DARCHIS, J. P.; GUELPA, C.; COLLATZ, E. Fluoroquinolone resistance linked to GyrA, GyrB, and ParC mutations in *Salmonella* enterica typhimurium isolates in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1455–1457, 2003.

CAVADA, C. A.; CARDOSO, F. M.; SCHIMIDT, V. Comparison of three methods for *Salmonella* sp. quantification in wastewater. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 1, p. 17-23, 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report), 2014b.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2013.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2014a.

CDC. National *Salmonella* Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. The Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool). Current search data, 2016.

CHAGAS, T. P. G.; SEKI, L. M.; CURY, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; DÁVILA, A. M.; SILVA, D. M.; ASENSI, M. D. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 572–581, 2011.

CHIA, T. W. R.; GOULTER, R. M.; MCMEEKIN, T.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 853–859, 2009.

CLSI 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 21th Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLSI 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 22th Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLSI 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 23th Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLSI 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard. 3rd ed. CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.

COASUL. Produção de frango paranaense alcança recorde histórico em julho. 2013. Disponível em: <<http://www.coasul.com.br/producao-de-frango-paranaense-alcanca-recorde-historico-em-julho/>>. Acesso em 1 de dez. de 2016.

CORTEZ, A. L. L.; CARVALHO, A. C. F. B.; IKUNO, A. A.; BÜRGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arquivos do instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 157-163, 2006.

COSSI, M. V. C.; ALMEIDA, M. V.; DIAS, M. R.; PINTO, P. S. A.; NERO, L. A. Inspected and non-inspected chilled chicken carcasses commercialized in Viçosa, MG, Brazil: microbiological parameters and *Salmonella* spp. occurrence. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1675-1681, 2012.

COSTA, F. N.; ROSSI JUNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; TAVECHIO, A. T. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças e cortes de frango obtidos na indústria e no comércio em Jaboticabal, Estado de São Paulo, em 1996. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 4, n. 3, p. 97-100, 1997.

CROFT, A. C.; D'ANTONI, A. V.; TERZULLI, S. L. Update on the antibacterial resistance crisis. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 6, p. 103-118, 2007.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 239-241, 1965.

DAVIES, J. E. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. **Ciba Foundation Symposium**, v. 207, p. 15-27, 1997.

DE SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 413-428, 2010.

DECHET, A. M.; SCALLAN, E.; GENSHEIMER, K.; HOEKSTRA, R.; GUNDERMAN-KING, J.; LOCKETT, J.; WRIGLEY, D.; CHEGE, W.; SOBEL, J. Outbreak of

multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Definitive Type 104 infection linked to commercial ground beef, Northeastern United States, 2003–2004. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 6, p. 747–752, 2006.

DELÚ, M. A. F.; SBAMPATO, C. G.; MENDONÇA, A. T.; ICCOLI, R. H.; MAIA, S. C. Avaliação microbiológica de cortes de frango resfriado, comercializados no município de lavras, MG. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 138, p. 83-85, 2006.

DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; ANDRADE, P. L. A.; FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 569-573, 2009.

EAVES, D. J.; RANDALL, L.; GRAY, D. T.; BUCKLEY, A.; WOODWARD, M. J.; WHITE, A. P.; PIDDOCK, L. J. V. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 4012–4015, 2004.

EDELSTEIN, M.; PIMKIN, M.; PALAGIN, I.; EDELSTEIN, I.; STRATCHOUNSKI, L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3724–32, 2003.

EFSA. European Food Safety Authority. The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v.13, n.1, p.165, 2015a.

EFSA. European Food Safety Authority. The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. **EFSA Journal**, v.13, n.4329, p.191, 2015b.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden, 2013.

FALAGAS, M. E.; KARAGEORGOPOULOS, D. E. Extended-spectrum Beta-lactamase-producing organisms. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 345–354, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. A field guide for diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis. Sample size considerations. 1998. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/x0413e/X0413E08.htm>>. Acesso em 12 de fev. de 2016.

FERIA, C. Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 77–85, 2002.

FERNANDES, R. T. V.; ARRUDA, A. M. V.; COSTA, M. K. O.; LIMA, P. O.; SANTOS, L. O. G.; MELO, A. S.; MARINHO, J. B. M. Physicochemical and microbiological parameters of frozen and chilled chicken meat. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 7, p. 417-421, 2016.

FERNANDES, S. A.; PATERSON, D. L.; GHILARDI-RODRIGUES, A. C.; ADAMS-HADUCH, J. M.; TAVECHIO, A. T.; DOI, Y. CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microbial drug resistance**, v. 15, n. 4, p. 317–21, 2009.

FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEME, S. N.; CALZADA, C. T.; DIAS, A. M. G.; NAKAHARA, L. K.; OLIVEIRA, J. C.; IRINO, K.; TAUNAY, A. E. Marcadores epidemiológicos de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Agona. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 91-98, 1992.

FINSTAD, S.; O'BRYAN, C. A.; MARCY, J. A.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. *Salmonella* and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 789–794, 2012.

FITCH, F. M.; CARMO-RODRIGUES, M. S.; OLIVEIRA, V. G.; GASPARI, M. V.; DOS SANTOS, A.; DE FREITAS, J. B.; PIGNATARI, A. C. β -Lactam Resistance Genes: Characterization, Epidemiology, and First Detection of blaCTX-M-1 and blaCTX-M-14 in *Salmonella* spp. Isolated from Poultry in Brazil-Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. **Microbial drug resistance**, v. 22, n. 2, p. 164–71, 2016.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 173-187, 2008.

FOLEY, S. L.; NAYAK, R.; HANNING, I. B.; JOHNSON, T. J.; HAN, J.; RICKE, S. C. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4273–4279, 2011.

FONTAINE, R. E.; ARNON, S.; MARTIN, W. T.; VERNON, T. M. JR.; GANGAROSA, E. J.; FARMER, J. J.; MORAN, A. B.; SILLIKER, J. H.; DECKER, D. L. Raw hamburger: an interstate common source of human salmonellosis. **American Journal of Epidemiology**, v. 107, p. 36–45, 1978.

FONZÉ, E. CHARLIER, P.; TO' TH, Y.; VERMEIRE, M.; RAQUET, X.; DUBUS, A.; FRÈRE, J. M. TEM1 Beta-lactamase structure solved by molecular replacement and refined structure of the S235A mutant. **Acta Crystallographica Section D Biology Crystallographica**, v. 51, n. 5, p. 682-694, 1995.

FRAVALO, P.; HASCOET, Y.; LE FELLIC, M.; QUEGUMER, S.; PETTON, J.; SALVAT, G.; Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella* enteric contamination: the mini-MSRV MPN technique. **Journal Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 81-88, 2003.

FUZHARA, T. O.; FERNANDES, S. A.; FRANCO, B. D. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 12, p. 1749-1753, 2000.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; GALLINA, S.; OWCZAREK, S.; DIONISI, A. M.; BENEDETTI, I.; DECASTELLI, L.; LUZZI, I. Emergence of Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi in Italy. **PloS One**, v. 10, n. 6, 2015.

GHAFIR, Y.; DIERICK, K.; ZUTTER, L. D. E. Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef , Pork , and Poultry Meats in Belgium. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p. 35–45, 2008.

GLYINN, M. K.; BOPP, C.; DEWITT, W.; DABNEY, P.; MOKHTAR, M.; ANQULO, F. J. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. **New England**, v. 338, n. 19, p. 1333-1338, 1998.

GREENWOOD, M. H.; HOOPER, W. L. Chocolate bars contaminated with *Salmonella* napoli: an infectivity study. **British Medical Journal**, v. 286, n. 6375, p. 1394, 1983.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 77–87, 2009.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed., 2007.

GÜERRI, M. L.; ALADUEÑA, A.; ECHEITA, A.; ROTGER, R. Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 327-333, 2004.

GUTMANN, L.; GOLDSTEIN, F. W.; RIZK, N.; COLLATZ, E. SHV-5 , Novel SHV-Type Beta-Lactamase That Hydrolyzes Broad- Spectrum Cephalosporins and Monobactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 6, p. 951–956, 1989.

HAMMAMI, A.; ARLET, G.; BEN REDJEB, S.; GRIMONT, F.; BEN HASSEN, A.; REKIK, A.; PHILIPPON, A. Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis in a neonatal intensive care unit in Tunisia caused by multiply drug resistant *Salmonella* wien producing SHV-2 beta-lactamase. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 10, n. 8 p. 614–616, 1991.

HARBOTTLE, H.; THAKUR, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 111–124, 2006.

HASMAN, H.; MEVIUS, D.; VELDMAN, K.; OLESEN, I.; AARESTRUP, F. M. β -Lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115–121, 2005.

HENZLER, D.J.; OPITZ, H.M. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella enteritidis* infection on chicken layer farms. **Avian Diseases**, v. 36, n. 3, p. 625-631, 1992.

HOFER, E.; DA SILVA FILHO, S. J.; MOURA, E.; DOS REIS, F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 21–27, 1998.

HOFER, E.; ZAMORA, M. R. N.; LOPES, A. E.; MOURA, A. M. C.; ARAÚJO, H. L.; LEITE, J. D. D.; LEITE, M. D. D.; SILVA FILHO, S. J. Sorovares de *Salmonella* em carne de equídeos abatidos no nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 80-84, 2000.

HOFFMANN, F. L.; MANSOR, A. P.; COELHO, A. R.; VINTURIM, T. M. Microbiologia de carcaças e carnes mecanicamente separadas (CMS), obtidas em abatedouro de aves da Região de São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 92/92, p.45-50, 2002.

HUMPHREY, T. J. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Science and Society**, v. 2, n. 6, p. 504-509, 2004.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 819–830, 2012.

INSTITUTO PASTEUR. Salmonellose, 2013. Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/salmonellose>>. Acesso em 5 de out. de 2016.

INTERNATION BULLETIN. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, v.4, n.1, 1954

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; et al. Supplement 2008-2010 (nº 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

ISO, 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.—amendment 1: Annex D: detection of *Salmonella* spp., in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (ISO 6579:2002/Amd. 1:2007).

ISO/ST, 2012. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*—part 2: enumeration by a miniaturized most probable technique (ISO/TS 6579-2: 2012).

JARVIS, N. A.; O'BRYAN, C. A.; DAWOUD, T. M.; PARK, S. H.; KWON, Y. M.; GRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. An overview of *Salmonella* thermal destruction

during food processing and preparation. **Food Control**, v. 68, p. 280–290, 2016.

JOHNSON, B. OSHA infectious dose white paper. **Applied Biosafety**, v. 8, n. 4, p. 160–165, 2003.

JUNEJA, V. K.; EBLEN, B. S.; RANSOM, G. M. Thermal Inactivation of *Salmonella* spp. in Chicken Broth, Beef, Pork, Turkey, and Chicken: Determination of D- and Z-values. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 1, p. 146-152, 2001.

KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M. Serovars of *Salmonella* spp. isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 3, p. 195-198, 2005.

KAO, C. Y.; CHEN, C. A.; LIU, Y. F.; WU, H. M.; CHIOU, C. S.; YAN, J. J.; WU, J. J. Molecular characterization of antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates: First identification of a plasmid carrying *qnrD* or *oqxAB* in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1-10, 2015.

KEELARA, S.; THAKUR, S. Dissemination of plasmid-encoded AmpC b-lactamases in antimicrobial resistant *Salmonella* serotypes originating from humans, pigs and the swine environment. **Veterinary Microbiology**, v. 173, p.76-83, 2014.

KINGSLEY, R. A.; BÄUMLER, A. J. Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiology**, v. 36, p. 1006–1014, 2000.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315–317, 1983.

KOTTWITZ, L. B. M.; BACK, A.; LEÃO, J. A.; FRAUSTO, H. S. E. G.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Decline of *Salmonella* Enteritidis in poultry, **British Food Journal**, v. 115, n. 11, p. 1541-1546, 2013.

KOTTWITZ, L. B. M.; DE OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOCER, I.; FARAH, S.; ABRAHÃO, W. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum - Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 9–15, 2010.

KOZACINSKI, L.; HADZIOSMANOVIĆ, M.; ZDOLEE, N. Microbiological quality of poultry meat on the Croatian market. **Veterinarski arhiv**, v. 76, n. 4, p. 305-313, 2006.

KUSUMANINGRUM, H. D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 227–236, 2003.

LEAL, N. C.; SÁ, A. T.; SOLARI, C. A.; SILVA, S. J.; HOFER, E. Sorotipos de *Salmonella* isolados de processos entéricos humanos em Recife-Pernambuco, durante o triênio 1978-1980. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 1, p. 43-49, 1987.

LEE, S.; CHOI, D.; KIM, H.; KIM, D.; SEO, K. Prevalence, Seasonal Occurrence, and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. Isolates Recovered from Chicken Carcasses Sampled at Major Poultry Processing Plants of South Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 10, p. 544-550, 2016.

LINDBLAD, M.; LINDMARK, H.; LAMBERTZ, S. T.; LINDQVIST, R. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 12, p. 2875-2882, 2006.

LU, Y.; WU, C. M.; WU, G. J.; ZHAO, H. Y.; HE, T.; CAO, X. Y.; DAI, L.; XIA, L. N.; QIN, S. S.; SHEN, J. Z. Prevalence of Antimicrobial Resistance Among *Salmonella* Isolates from Chicken in China. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 1, p. 45-53, 2010.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. M. The Global Burden of Nontyphoidal Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.

MARINELI, F.; TSOUCALAS, G.; KARAMANOU, M.; ANDROUTSOS, G. Mary Mallon (1869-1938) and the history of typhoid fever. **Annals of Gastroenterology**, v. 26, n. 2, p. 132-134, 2013.

MASCARETTI, O. A. **Bacteria versus Antimicrobial Agents: An Integrated Approach**. Washington, D.C: ASM, 2003.

MATHEUS, D. P.; RUDGE, A. C.; GOMES, S. M. M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 111-115, 2003.

MATIAS, B. G.; PINTO, P. S.; COSSI, M. V.; NERO, L. A.; *Salmonella* spp. and hygiene indicator microorganisms in chicken carcasses obtained at different processing stages in two slaughterhouses. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 3, p. 313-318, 2010.

MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. **International Journal of Toxicology**, v. 22, p.135-143, 2003.

MCQUISTON, J. R.; PARRENAS, R.; ORTIZ-RIVERA, M.; GHEESLING, L.; BRENNER, F.; FIELDS, P.I. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *flpA* from *Salmonella*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.5, p. 1923-1932, 2004.

- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 607–625, 1999.
- MEDEIROS, M. A. N.; OLIVEIRA, D. C. N. DE; RODRIGUES, D. D. P.; FREITAS, D. R. C. DE. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 30, n. 6, p. 555–560, 2011.
- MESQUITA, M. O.; DANIEL, A. P.; SACCOL, A. L. F.; MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 26, n. 1, p. 198-203, 2006.
- MION, L.; PARIZOTTO, L.; SANTOS, L. A.; WEBBER, B.; CISCO, I. C.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L. B.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. *Salmonella* spp. Isolated by Miniaturized Most Probable Number and Conventional Microbiology in Poultry Slaughterhouses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 0, p. 1–5, 2016.
- MONTEIRO, J. C.; VAZ-PIRES, P.; BARROS, R. M. Avaliação do grau de conformidade da rotulagem de géneros alimentícios de origem animal face à legislação nacional e comunitária em vigor. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 563-564, p. 343-349, 2007.
- MOREIRA, G. N.; REZENDE, C. S. M.; CARVALHO, R. N.; MESQUITA, S. Q. P.; OLIVEIRA, A. N.; ARRUDA, M. L. T. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de oíás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 126-130, 2008.
- MORRIS, D.; WHELAN, M.; CORBETT-FEENEY, G.; CORMICAN, M. First report of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates in Ireland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1608–1609, 2006.
- MOTA, C. C.; VIEIRA, H. R.; PUZYNA, I. P.; KALACHE, J.; KONOLSAISEN, J. F.; CAMARGO, N. L. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil/julho de 1981. **Revista Higiene Alimentar**, v. 2, n. 3, p. 123-126, 1983.
- MOUSSA, I. M.; HESSAIN, A. M.; GASSEN, M. A.; AL-ARFAJ, A. A.; MOHAMED, I. A. H. Genotyping of *Salmonella enterica* collected from poultry farms located in Cairo, Egypt by Multiplex-PCR. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 12, n. 1, p. 195-198, 2014.
- MPN CALCULATION PROGRAM. Versão 3, de 13 de janeiro de 2013. Disponível em: <<http://standards.iso.org/iso/ts/6579/-2/>>.
- MULVEY, M. R.; SOULE, G.; BOYD, D.; DEMCZUK, W.; AHMED, R. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 460–462, 2003.

M'ZALI, F. M.; GASCOYNE-BINZI, D. M.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P. M. Brief reports Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV / Beta-lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 797–802, 1996.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; GIESSEN, J. V. D.; KRUSE, H. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S3–S15, 2010.

NGOI, S. T.; THONG, K. L. Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella* Enteritidis isolated from humans and animals in Malaysia. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 77, n. 4, p. 304–11, 2013.

NODA, T.; MURAKAMI, K.; ETOH, Y.; OKAMOTO, F.; YATSUYANAGI, J.; SERA, N.; FURUTA, N.; ONOZUKA, D.; ODA, T.; ASAI, T.; FUJIMOTO, S. Increase in Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in *Salmonella* Isolated from Retail Chicken Products in Japan. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. 1-18, 2015.

NUNES, I. A.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; OLIVEIRA, A. N. Ocorrência de *Salmonella* em carcaças e cortes de frango comercializados em Goiânia-GO. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 25, n. 2, p. 1-5, 1995.

OSCAR, T. P.; RUTTO, G. K.; LUDWIG, J. B.; PARVEEN, S. Qualitative map of *Salmonella* contamination on young chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 9, p. 1596-603, 2010.

PALMEIRA, A.; SANTOS, L. R.; BORSOI, A.; RODRIGUES, L. B.; CALASANS, M.; NASCIMENTO, V. P. Serovars and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. isolated from Turkey and Broiler Carcasses in Southern Brazil Between 2004 and 2006. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 19, p. 1-5, 2016.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p.1-6, 2015.

PANZENHAGEN, P. H. N.; AGUIAR, W. S.; DA SILVA FRASÃO, B.; PEREIRA, V. L. A.; ABREU, D. L. C.; RODRIGUES, D. P.; NASCIMENTO, E. R.; AQUINO, M. H. C. Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Control**, v. 61, p. 243–247, 2016.

PARANÁ. Casa Civil. Lei Estadual nº 15.825, de 28 de abril de 2008. Inclui os Municípios de Palmas, Clevelândia, Honório Serpa, Coronel Domingos Soares e Mangueirinha na Região Sudoeste do Estado do Paraná, para todos os efeitos

estatísticos de órgãos públicos do Estado do Paraná. Diário Oficial do Estado do Paraná

PARRY, C. M.; THRELFALL, E. J. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 5, p. 531–538, 2008.

PEIRANO, G.; AGERSO, Y.; AARESTRUP, F. M.; DOS REIS, E. M.; RODRIGUES, D. P. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.305–309, 2006.

PIMENTEL, E. F.; DIAS, R. S.; RIBEIRO-CUNHA, M; GLÓRIA, M. B. A. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química e microbiológica de queijo ralado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 289-294, 2002.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L.E. **Bergey`s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Vol. 2: The Proteobacteria. 2nd ed. New York, NY: Springer-Verlag US, 2005, 2816 p.

POPPE, C. Salmonellosis in poultry and people. **Supplement of World Poultry-Misset**, p. 13-14, 1996.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Agentes Antimicrobianos. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1st. ed. Editora Artmed, 2010. 42-49 p.

RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A. J. Non-typhoid salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 237-247, 2001.

RALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; SILVA, M. G.; RALL, R.; ARAUJO JUNIOR, J. P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e linguiças comercializados na cidade de Botucatu. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 167-174, 2009.

RIEMANN, H.; KASS, P.; CLIVER, D. *Salmonella enteritidis* epidemic. **Science**, v. 10, n. 287, p. 1754-1755, 2000.

REZENDE, C. S. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, n. 555-556, p. 199–203, 2005.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; DOS SANTOS, L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: Occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 296–299, 2007.

RIBEIRO, V. B.; LINCOPAN, N.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in

multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 685-692, 2011.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

RISTORI, C. A.; BERGAMINI, A. M. M.; ROWLANDS, R. E. G.; LOPES, G. I. S. L.; DE PAULA, A. M. R.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, E. G. A.; DELLA TORRE, J. C. M.; PRADO, S. P. T.; YOSHIDA, J. T. U.; RODRIGUES, R. S. M.; TAHA, O. G.; MARSIGLIA, D. A. P.; JAKABI, M. Quantificação de *Salmonella* spp. e avaliação dos dizeres de rotulagem de carcaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 52, p.16-19, 2008.

ROCHA, P. T.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LOULY, P. R.; NASCIMENTO, M. N. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte de frangos e pintos de um dia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 672–676, 2003.

SAEED, A. A.; HASOON, M. F.; MOHAMMED, M. H. Isolation and Molecular Identification of *Salmonella typhimurium* from Chicken Meat in Iraq. **Journal of World's Poultry Research**, v. 3, n. 2, p. 63–67, 2013.

SALMONELLA SUBCOMMITTEE. The Genus *Salmonella* Lignères, 1990. **The Journal of Hygiene**, v. 34, n. 3, p. 333-350, 1934.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI, A.; FERNANDAS, S. A.; TAVECHIO, A. T.; DO AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39–42, 2000.

SANTOS, L. A. DOS; MION, L.; MAROTZKI, M.; PARIZOTTO, L.; RODRIGUES, L. B.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 223–229, 2015.

SCUR, M. C.; PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; WEBER, L. D.; ALVES, L. F. A.; MOURA, A. C. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 9, p. 823-830, 2014.

SHASHIDHAR, R.; SRIVASTAVA, I.; BANDEKAR, J. R. Quantification of *Salmonella* in Food Samples from India Using the MINI-MSRV MPN and Modified MINI-MSRV MPN Methods. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, 2011.

SILVA, E.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85–100, 2002.

SILVA, J. A.; AZERÊDO, G. A.; BARROS, C. M. R.; COSTA, E. L.; FALCÃO, M. M.

S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 100, p. 97-101, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela. 2001, 317 p.

SILVA, R. A. Secretaria de Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná. Análise da conjuntura agropecuária, safra 2008/2009. Avicultura de corte. 2008.

SINDIAVIPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. Estatísticas: Produção avícola (aves em geral). 2016a. Disponível em: <<https://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=8&acao=detalhe&cod=1008>>. Acesso em 1 de dez. de 2016.

SINDIAVIPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. Imprensa. PR: Exportações avícolas crescem quatro vezes mais que a média nacional em 2014. 2015a. Disponível em: <https://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=15&acao=detalhe&cod=165570>. Acesso em 1 de dez de 2016.

SINDIAVIPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. Imprensa. PR: Exportação avícola cresce 19% no primeiro quadrimestre do ano. 2016b. Disponível em: <<https://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=15&acao=detalhe&cod=175314>>. Acesso em 1 de dez. de 2016.

SINDIAVIPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. Indústrias Associadas, 2014. Disponível em: <<http://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=4&acao=detalhe&cod=159292>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.

SINGH, S.; AGARWAL, R. K.; TIWARI, S. C.; SINGH, H. Antibiotic resistance pattern among the *Salmonella* isolated from human, animal and meat in India. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 3, p. 665–674, 2012.

SMITH, A. C. L.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. A. Rotulagem de alimentos: avaliação da conformidade frente à legislação e propostas para a sua melhoria. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v.70, n.4, 2011.

SODAGARI, H. R.; MASHAK, Z.; GHADIMIANAZAR, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from retail chicken meat and giblets in Iran. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 5, p. 463–469, 2015.

STEVENSON, J. E.; GAY, K.; BARRETT, T. J.; MEDALLA, F.; CHILLER, T. M.; ANGULO, F. J. Increase in Nalidixic Acid Resistance among Non-Typhi *Salmonella enterica* Isolates in the United States from 1996 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 195-195, 2007.

SUNDSTRÖM, L.; RÅDSTRÖM, P.; SWEDBERG, G.; SKÖLD, O. Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of dhfrV and sull and a recombination active locus of Tn21. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 213, n. 2-3, p. 191–201, 1988.

SWAMY, S. C.; BARNHART, H. M.; LEE, M. D.; DREESEN, D. W. Virulence Determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* Isolated from Poultry Products, Wastewater, and Human Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3768–3771, 1996.

TENNANT, S. M.; MACLENNAN, C. A.; SIMON, R.; MARTIN, L. B.; KHAN, M. I. Nontyphoidal *Salmonella* disease: Current status of vaccine research and development. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2907-2910, 2016.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. I. Incidência de *Salmonella* spp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 3, p. 279-281, 2003.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A. G. M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2557-2560, 2008.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZÉBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 521–524, 2005.

TIROLI, I. C. C.; COSTA, C. A.; Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frango recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus - AM. **Acta Amazon**, n. 36, p.205-208, 2006.

TRAINOTTI, A. C.; MORAES, F. F.; BEGOTTI, I. L.; MERLINI, L. S. Ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de frangos industrialmente processados procedentes de explorações industriais da região Noroeste do estado do Paraná - Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 1965-1970, 2013.

USDA/FSIS. FSIS Directive. *Salmonella* and *Campylobacter* verification program for raw meat and poultry products. 2013.

USDA/FSIS. The Nationwide Microbiological Baseline Data Collection Program: Raw Chicken Parts Survey (RCPBS), January 2012 – August 2012. Disponível em: <https://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/Baseline_Data_Raw_Chicken_Parts.pdf>. Acesso em 10 de dez de 2016.

UYTTENDAELE, M R.; DEBEVERE, J. M.; LIPS, R. M.; NEYTS, K. D. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, p.1–8, 1998.

VARDAKAS, K. Z.; TANSARLI, G. S.; RAFAILIDIS, P. I.; FALAGAS, M. E. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. 2793–2803, 2012.

VÁZQUEZ, E. G.; TORRES, A. H.; MARTÍNEZ, J. A. H.; GÓMEZ, J. G. Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia*. **Medicine (Spain)**, v. 11, n. 56, p. 3322–3326, 2014.

VEIGA, L. A.; ALIEVI, A. A. Expansão da produção de aves no Paraná e a subordinação De pequenos proprietários de terras às agroindústrias avícolas. **ACTA Geográfica**, v. 6, n. 11, p. 83-95, 2012.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J. A.; RODRIGUES, D. P. BACK, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015.

WASYL, D.; HOSZOWSKI, A. First isolation of ESBL-producing *Salmonella* and emergence of multiresistant *Salmonella* Kentucky in turkey in Poland. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 958–961, 2012.

WATERS, S. H.; ROGOWSKY, P.; GRINSTED, J.; ALTENBUCHNER, J.; SCHMITT, R. The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721: nucleotide sequence analysis. **Nucleic acids research**, v. 11, n. 17, p. 6089–6105, 1983.

WHO. World Health Organization. 10 Facts on Antimicrobial resistance. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/index.html>. Acesso em: 30 de novembro de 2015.

WILLIAMSON, R.; LE BOUGUENEC, C.; GUTMANN, L.; HORAUD, T. One or two low affinity penicillinbinding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. **Journal of General Microbiology**, v. 131, n. 8, p. 1933–1940, 1985.

WINOKUR, P. L.; CANTON, R.; CASELLAS, J. M.; LEGAKIS, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 94-103, 2001.

WOERTHER, P. L.; BURDET, C.; CHACHATY, E.; ANDREMONT, A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 744–758, 2013.

YAH, C.S. Plasmid-Encoded Multidrug Resistance: A Case study of *Salmonella* and *Shigella* from enteric diarrhea sources among humans. **Biological Research**, v. 43, p. 141-148, 2010.

YAMATOOGI, R. S.; PADOVANI, C. R.; GALVÃO, J. A.; BERSOT, L. S.; PINTO, J. P. A. N. *Salmonella* spp. in poultry carcass: evaluation of sample preparation methods and effect of storage under refrigeration on pathogen recovery. **Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 50-53, 2012.

YANG, B.; CUI, Y.; SHI, C.; WANG, J.; XIA, X.; XI, M.; WANG, X.; MENG, J. ALALI, W. Q.; WALLS, I.; DOYLE, M. P. Counts, Serotypes, and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolates on Retail Raw Poultry in the People's Republic of China. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 6, p. 894–902, 2014a.

YANG, B.; QIAO, L.; ZHANG, X.; CUI, Y.; XIA, X.; CUI, S.; WANG, X.; MENG, X.;

GE, W.; SHI, X.; WANG, D.; MENG, J. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulsed field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. **Food Control**, v. 32, p. 228-235, 2013.

YANG, B.; WANG, Q.; CUI, S.; WANG, Y.; SHI, C.; XIA, X.; XI, M.; WANG, X.; SHI, X.; WANG, D.; ZHANG, Z.; MENG, J. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Salmonella* strains isolated from retail foods in Shaanxi and Henan Province, China. **Food Microbiology**, v. 42, p. 14-18, 2014b.

YOUNG, R. The Lipopolysaccharide of *Haemophilus parainfluenzae*, 2011.

ZHAO, S.; BLICKENSTAFF, K.; GLENN, A.; AYERS, S. L.; FRIEDMAN, S. L.; ABBOTT, J. W.; MCDERMOTT, P. F. Beta-Lactam resistance in *Salmonella* strains isolated from retail meats in the United States by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System between 2002 and 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7624-763, 2009.

ZIECH, R. E.; LAMPUGNANI, C.; PERIN, A. P.; SERENO, M. J.; SFACIOTTE, R. A. P.; VIANA, C.; SOARES, V. M.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. S. Multidrug resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 191-195, 2016b.

ZIECH, R. E.; PERIN, A. P.; LAMPUGNANI, C.; SERENO, M. J.; VIANA, C.; SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. S. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 85-90, 2016a.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - *CHECK LIST* APLICADO NOS RÓTULOS E EMBALAGENS DE CORTES DE FRANGO

CHECKLIST - EMBALAGEM - CORTES DE FRANGO CONGELADOS			
NÚMERO DA AMOSTRA:	DATA DE ANÁLISE:		
TIPO DE CORTE:	COMPRADO NA CIDADE DE:		
DATA DE FABRICAÇÃO:	COMPRADO NO MERCADO:		
DATA DE VALIDADE:	MARCA:		
LOTE:	PRODUZIDO POR:		
SIF:	CONGELAMENTO: ()IQF ()BDJ ()PACOTE NÃO IQF		

	C	NC	NA
Embalagem intacta			
Ingredientes			
Lista de ingredientes			
Declaração dos aditivos alimentares na lista de ingredientes			
Declaração dos valor calórico, nutrientes e componentes			
Identificação de origem			
Nome ou razão social			
Endereço do estabelecimento			
Carimbo oficial da Inspeção Federal			
Categoria do estabelecimento segundo classificação oficial			
CNPJ do fabricante			
Registrado no MAPA/SIF/DIPOA nº...			
Contato do Serviço de atendimento ao consumidor			
Peso			
Peso igual ao indicado na embalagem			
Indicação do peso			
Conservação/Preparo			
Instrução sobre uso/preparo do produto			
Forma de conservação do produto			
Rotulagem			
Marca comercial do produto			
Composição do produto			
Denominação (nome) de venda do produto de origem animal			
Resolução-RDC nº13 (02/01/2001)			
Esse alimento, se manuseado incorretamente e/ou consumido cru, pode causar danos à saúde.			
Para sua segurança, siga as instruções abaixo: - mantenha refrigerado ou congelado; - descongele somente no refrigerador ou no micro-ondas; - mantenha o produto cru separado dos outros alimentos; - lave com água e sabão as superfícies (incluindo as tábuas de corte), utensílios e mãos depois de manusear o produto cru; - consuma somente após cozido, frito ou assado completamente.			